

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Citotoxicidad celular espontánea : caracterización de sus
células efectoras : aumento de la actividad citotóxica
espontánea por interferon**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Augusto Silva González

DIRECTOR:

Manuel Ortiz de Landazuri

Madrid, 2015

TP
1983

Augusto Silva González



*-50- 810635-4

CITOTOXICIDAD CELULAR ESPONTANEA. CARACTERIZACION DE SU CELULAS
EFECTORAS. AUMENTO DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA
ESPONTANEA POR INTERFERON

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1983

»

Colección Tesis Doctorales. Nº

178/83

© Augusto Silva González
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1983
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-23178-1983

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGICAS

CITOTOXICIDAD CELULAR ESPONTANEA. CARACTERIZACION DE
SUS CELULAS EFECTORAS. AUMENTO DE LA ACTIVIDAD CITO-
TOXICA ESPONTANEA POR INTERFERON.

MEMORIA

QUE PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

PRESENTA

AUGUSTO SILVA GONZALEZ

ENERO 1981

Agradezco la revisión y
presentación de este tra-
bajo al Profesor D. Angel
Martin Municio.

A Maribel, a la que amo y
admiro.

El presente trabajo ha sido
realizado en el Servicio de In-
munologia de la Clinica Puerta
de Hierro, bajo la dirección del
Dr. M. Ortiz de Landazuri.

A los Drs M. O. de Landazuri, M.
Kreisler, A. Durantez, J. Alvarez,
M. Lopez-Botet, J. Rodriguez, y a
la excelente labor tecnica de M. Muñoz,
C. Lorences, y G. Peraile; a Estela,
y a todo el Servicio de Inmunología,
pasado y presente, mi total agradeci-
miento, por enseñarme. Sólo espero
no defraudarlos.

INDICE

OBJETO DEL PRESENTE TRABAJO	viii
I. INTRODUCCION	1
I.1. CONCEPTOS ESENCIALES DEL SISTEMA INMUNE	1
I.2. LINFOCITOS B	6
I.2.1. Funciones de los linfocitos B	6
I.2.2. Estructura de las inmunoglobulinas	7
I.2.3. Marcadores de superficie del linfocito B	10
I.2.3.1. Inmunoglobulinas de superficie	10
I.2.3.2. Receptores para el complemento	11
I.2.3.3. Receptores para el Fc de la IgG e IgM ...	12
I.3. MACROFAGOS	12
I.3.1. Marcadores del macrófago	13
I.3.2. El macrófago y su relación con los linfocitos T y B	14
I.4. LINFOCITOS T	16
I.4.1. Características y marcadores de superficie....	16
I.4.2. Subpoblaciones de linfocitos T humanos	18
I.4.3. Heterogeneidad funcional de los linfocitos T..	20
I.4.3.1. Linfocitos T reguladores: Ayudadores y supresores	20
I.4.3.2. Linfocitos T efectores: MLC, CML e Hipersensibilidad retardada.....	22

I.5. LINFOCITOS "NULL"	27
I.6. CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUER- PO Y DE LECTINAS	28
I.7. CITOTOXICIDAD ESPONTANEA	30
I.7.1. Características de la célula efectora NK	30
I.7.2. Especificidad de las células NK	36
I.7.3. Factores que afectan a la actividad NK	37
I.7.3.1. El interferón.....	39
I.7.4. Papel biológico de las células NK	41
II. MATERIAL Y METODOS	43
II.1. MATERIAL PARA CULTIVOS CELULARES	43
II.2. REACTIVOS	44
II.3. PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	46
II.4. LINEAS TUMORALES	46
II.5. ANIMALES USADOS	48
II.6. PREPARACION DE LAS CELULAS LINFOIDES	49
II.7. ELIMINACION PARCIAL DE CELULAS ADHERENTES.....	51
II.7.1. Por pase a través de columnas de nylon	51
II.7.2. Tratamiento con polvo de hierro	52
II.8. MARCADORES DE SUPERFICIE DE LAS DISTINTAS POBLA- CIONES LINFOCITARIAS	53
II.8.1. Detección de células con receptores para el hematíe de carnero	53

II.8.2. Detección de células con inmunoglobulinas de superficie	55
II.8.3. Detección de células con receptores para el fragmento Fc de la IgG	55
II.8.4. Detección de células con receptores para el Fc de la IgM	56
II.8.5. Detección de células capaces de ingerir par- ticulas de latex	57
II.8.6 Tinción de esterasas inespecificas para la identificación de monocitos y macrófagos....	58
II.9. SEPARACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA EN SUS DIFERENTES SUBPOBLACIONES	59
II.9.1. En función de sus marcadores de superficie..	59
II.9.1.1. Preparación de linfocitos T y no T	59
II.9.1.2. Preparación de linfocitos T_G y no T_G ..	62
II.9.1.3. Preparación de células $Fc(7S)^+$ y $Fc(7S)^-$	64
II.9.2. En función de su tamaño y densidad en un gradiente de Percoll	66
II.10 MONOCAPAS CELULARES PARA INMUNOADSORCION	67
II.10.1. Formación de la monocapa	67
II.10.2. Adsorción de células efectoras	68
II.11. ENSAYO CITOTOXICO POR SUELTA DE ^{51}Cr	69
II.11.1. Marcaje con el isótopo ^{51}Cr de las células diana	69

II.11.2. Preparación de las células efectoras y procedimiento	69
II.12. TECNICA DE FORMACION DE CONJUGADOS	73
II.13. TECNICA DE CONJUGADOS CITOTOXICOS EN AGAROSA	73
II.14. TRATAMIENTO DE LOS LINFOCITOS CON INTERFERON	74
III. RESULTADOS	75
III.1. CARACTERIZACION DE LA CELULA EFECTORA EN CITO- TOXICIDAD ESPONTANEA	75
III.1.1. Formacion de conjugados en las diferentes subpoblaciones linfocitarias	75
III.1.2. Actividad citotóxica de las diferentes subpoblaciones linfocitarias	84
III.1.2.1. Estudio de diferentes subpoblaciones de sangre periferica	84
III.1.2.2. Citotoxicidad espontánea en diferen- tes órganos linfoides	92
III.1.3. Demostración de que la integridad del re- ceptor Fc(7S) de la célula efectora NK, no es necesario para llevar a cabo su fun- ción citotóxica	99
III.1.4. Linfocitos grandes granulares como célu- las efectoras en citotoxicidad NK	105
III.2. DEMOSTRACION DE QUE LAS CELULAS EFECTORAS EN NK PERTENECEN A LA MISMA POBLACION QUE LAS CE- LULAS EFECTORAS EN ADCC	113

III.2.1. Experimentos de inhibición usando células diana frías	115
III.2.2. Experimentos de adsorción	121
III.3 ACTIVACION DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA ESPONTANEA POR INTERFERON	132
III.3.1. Aumento de la actividad citotóxica por IFN..	132
III.3.1.1. El IFN no aumenta el número de conjugados totales, aunque si el número de conjugados citotóxicos	133
III.3.1.2. Concentración y cinetica de la activación por IFN	135
III.3.1.3. Efecto reversible de la acción del IFN sobre células NK	142
III.3.2. Aumento de la actividad NK por IFN en diferentes subpoblaciones linfocitarias	143
III.3.2.1. Separación de subpoblaciones en función de los marcadores de superficie ...	143
III.3.2.2. Separación de subpoblaciones en función de su tamaño y densidad en un gradiente de Percoll	147
IV. DISCUSION	153
V. CONCLUSIONES	172
VI. BIBLIOGRAFIA	175

ABREVIATURAS USADAS EN EL PRESENTE TRABAJO

S.I.	Sistema Inmune
MHC.	Sistema mayor de histocompatibilidad
Ig.	Inmunoglobulina
MEM	Medio minimo esencial
V _H	Dominios variables de la cadena pesada
V _L	Dominios variables de la cadena ligera
C _H	Dominios constantes de la cadena pesada
C _L	Dominios constantes de la cadena ligera
T _A	Células T ayudadoras
T _S	Células T supresoras
T _C	Células T citotóxicas
MLR	Cultivo mixto de linfocitos
CML	Linfocitotoxicidad mediada por células
PBS	Tampon salino-fosfato
FCS	Suero bovino fetal
GA	Glutaraldehido
NK	Citotóxicidad espontanea
ADCC	Citotóxicidad dependiente de anticuerpo
LICC	Citotóxicidad mediada por lectinas
PHA	Fitoheماغlutinina
PLL	Poli-L-lisina
H-2	Sistema principal de histocompatibilidad en ratón
HLA	Sistema principal de histocompatibilidad en humanos

SRBC	Hematíes de carnero
HRBC	Hematíes humanos
CRBC	Hematíes de pollo
OxRBC	Hematíes de buey
K	Célula efectora en citotóxicidad ADCC
Fc(7S) ⁺	Célula con receptores para el Fc de la IgG
Fc(7S) ⁻	Célula sin receptores para el Fc de la IgG
E	Hematíes de carnero
T _γ	Linfocitos T con receptores para el Fc de la IgG
T _μ	Linfocitos T con receptores para el Fc de la IgM
AET	2-aminoetil-isotiouranio bromuro hidrobromuro
INF	Interferon
BSS	Tampon salino fosfato
LGL	Linfocito grande granular
aa	aminoacido
U.L.	Unidades liticas

OBJETO DEL PRESENTE TRABAJO

Uno de los mecanismos de defensa del Sistema Inmune, lo constituye la actividad citotóxica, llevada a cabo por células inmunocompetentes con capacidad para destruir, mediante diferentes mecanismos, células consideradas como "extrañas". La citotóxicidad celular espontanea es uno de estos mecanismos, en el cual la célula efectora no habiendo sido previamente inmunizada, es capaz de destruir células tumorales, considerándose por ello imbricada en los procesos de "vigilancia inmunológica".

Dado que esta actividad citotóxica ha sido descrita recientemente, se desconocen muchos aspectos de ella, tales como, mecanismos, características de la célula efectora, modulación por diferentes agentes...etc. Por ello nosotros hemos estudiado:

- 1) Caracterización, mediante marcadores de superficie, de la célula efectora que media esta citotóxicidad, en su doble vertiente, de formación de conjugados con células tumorales y de su actividad lítica. Estos estudios pueden permitir el aislamiento y purificación de la población efectora, bien en base a sus propiedades físicas o por su localización dentro de las di

ferentes subpoblaciones linfocitarias humanas.

2) Dado que estudios previos mostraban una gran similitud entre las poblaciones efectoras que median la citotóxicidad espontánea y la citotóxicidad celular dependiente de anticuerpo, averiguar si ambas citotóxicidades están mediadas por la misma población efectora y si ambas poseen los mismos requerimientos para llevar a cabo sus mecanismos líticos.

3) Recientemente se ha descrito que la actividad citotóxica espontánea puede ser aumentada por el interferón. Nuestro objetivo ha sido triple: a) averiguar si este aumento se debe a un reclutamiento de nuevas células citotóxicas o a una mayor efectividad de las ya existentes, b) si el interferón modifica el rango de especificidades de la célula efectora, y c) investigar cuál es la población celular que se activa por interferón.

I. INTRODUCCION

I.1. CONCEPTOS ESENCIALES DEL SISTEMA INMUNE

Los vertebrados poseen un mecanismo de defensa denominado "Sistema Inmune" que los protege del ataque de los microorganismos, tales como virus y bacterias, y de las células tumorales. El sistema inmune (S.I.) reconoce y elimina específicamente a aquellas sustancias extrañas al organismo que logran penetrar la barrera exterior de los vertebrados.

La protección inmunitaria en estos organismos se da a través de un sistema doble que mantiene dos tipos de defensa contra los invasores y que responden específicamente contra la mayoría de las sustancias extrañas: a) el sistema humoral, que se basa en la presencia de estructuras proteicas circulantes, anticuerpos, capaces de unirse al antígeno y b) la inmunidad celular, que se basa en el propio papel efector de las células del sistema linfóide. De esta dualidad son responsables dos poblaciones de células linfoides, morfológicamente indistinguibles, denominadas linfocitos. En un tipo

de linfocitos, "linfocitos T", reside la respuesta de tipo celular; mientras que en los "linfocitos B" está el inicio de la respuesta humoral. Además de los linfocitos, el S.I. depende de otros tipos de células denominadas accesorias, entre las que cabe destacar a los monocitos-macrófagos, cuyas funciones facilitan o regulan el desarrollo de la respuesta inmune(1-5).

En esencia, el S.I., se caracteriza por el reconocimiento de estructuras de macromoléculas que no son constituyentes normales del organismo. Estas entidades que el S.I. reconoce se denominan antígenos, mientras que la parte del antígeno a la cual se une el anticuerpo, se denomina determinante antigénico o epitope. Se denominan inmunógenos a aquellas macromoléculas extrañas al organismo capaces de activar el S.I., aunque hay pequeñas moléculas que no son inmunógenos (haptenos) que pueden disparar esta respuesta si están unidas a una molécula portadora (6).

También las células pueden ser antigénicas, y lo son a través de estructuras de superficie que las diferencian de las células de otro individuo. Estas estructuras llamadas "antígenos de histocompatibilidad" determinan el reconocimiento y aceptación o rechazo de injertos. Su estructura está codificada por el "Sistema mayor de histocompatibilidad"

(MHC), que son sistemas multialelicos de los cuales los mas importantes son el HLA en humanos y el H-2 en ratón. Tanto el HLA como el H-2 codifican tres tipos diferentes de moléculas: los determinantes SD (Clase I) "serologically determined", que se ponen de manifiesto con el uso de anti-sueros; estructuras LD (Clase II) "lymphocyte determined", que solo son detectadas en reacciones linfocitarias, y otras estructuras (Clase III) que controlan la expresión de algunos componentes séricos inespecíficos pertenecientes al sistema de Complemento, que también juegan un importante papel en el desarrollo del S.I.. Todas estas estructuras hacen que las células sean de por sí inmunogénicas, activando tanto la respuesta humoral como la respuesta celular.(7-9).

Las células linfoides tienen su origen en la célula madre (stem cell) de la médula osea; éstas, emigran hacia unos tejidos linfoides predeterminados denominados "primarios", que son el timo y la médula osea (bolsa de Fabricio en aves), donde maduran por la influencia del microentorno en linfocitos T y linfocitos B, respectivamente. Esta fase de maduración celular parece que es independiente del estímulo antigénico, y los linfocitos que se diferencian y maduran en estos órganos comienzan a ser inmunocompetentes, es decir adquieren los receptores de superficie antigénicos específicos y la maquinaria necesaria para responder al estímulo antigénico.(10-12).

Solo unos pocos linfocitos saldrán de estos órganos primarios, considerados ahora como linfocitos "virgenes" (no activados por el antígeno) y éstos emigraran y viajaran a traves de los tejidos y órganos por dos circuitos: la sangre y el sistema linfático. Sin embargo, los linfocitos contactan y responden con los antígenos inmunizantes en órganos linfoides especiales que poseen las estructuras y células accesorias necesarias para el correcto procesamiento y presentación antigénica. Estos órganos denominados "secundarios" son principalmente el bazo y el sistema de ganglios linfáticos donde los linfocitos T y B se distribuyen en unas posiciones determinadas y fijas, y donde tendrá lugar la activación antigénica de las células linfoides.(13)

Por último, la activación de las células linfoides, a traves de la unión con el antígeno por sus estructuras de superficie, no es todavia conocida. Probablemente, solo aquellos receptores que se unan al antígeno con una determinada avidéz puedan iniciar la activación(14), linfocitos que pueden encontrarse uno de cada 10^4 ó 10^5 células (14).

Tras la interacción antigénica, los linfocitos B se transforman en células plasmáticas las cuales segregarán inmunoglobulinas, mientras que los linfocitos T adquieren ciertas características efectoras que controlarán la respuesta

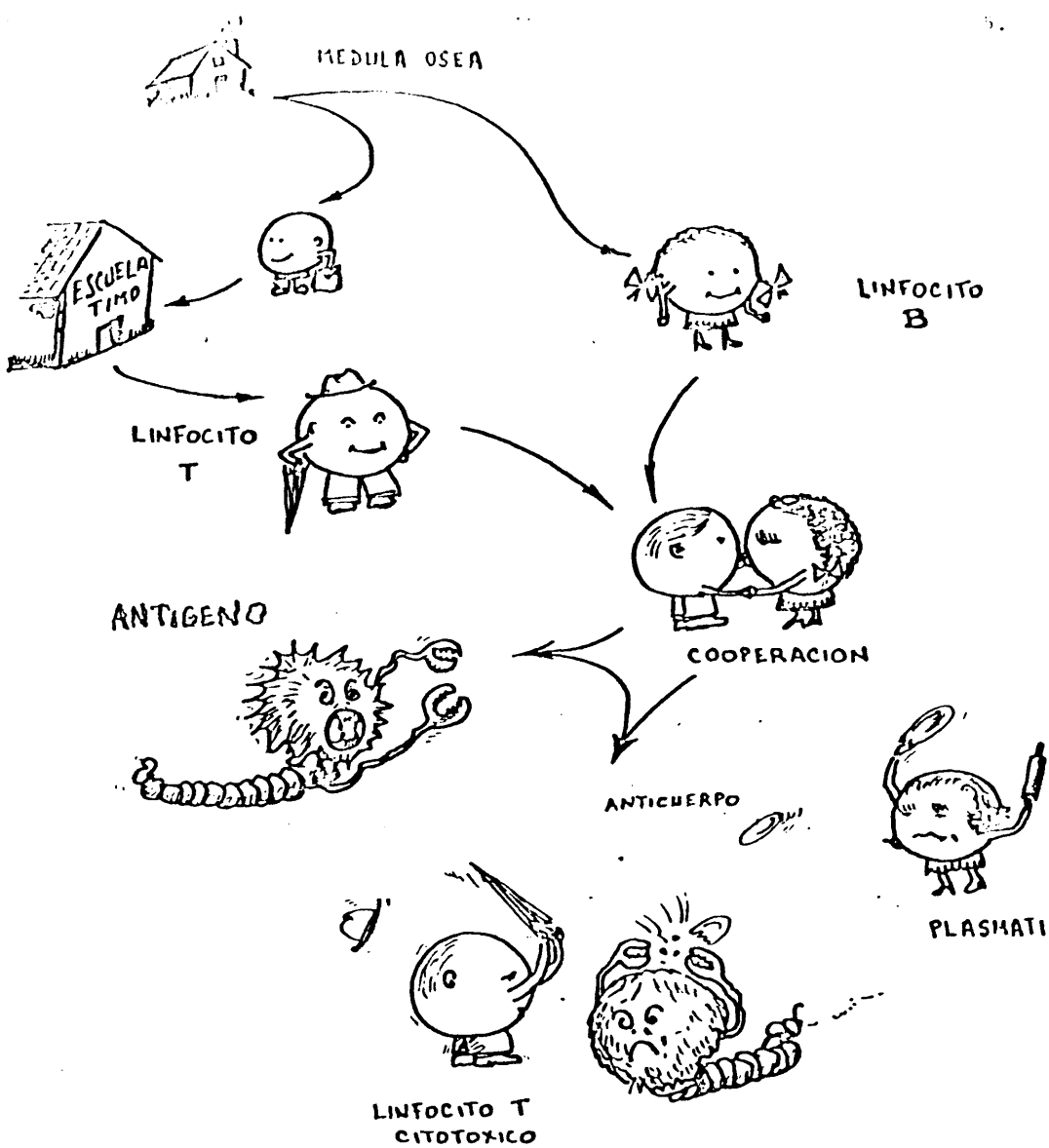


Figura 1.

celular(rechazo alogénico, reacciones de injerto contra huesped, hipersensibilidad de tipo retardado, destrucción de células infectadas con virus...etc.) y colaborarán con los linfocitos B en la respuesta inmune a ciertos antígenos denominados timo-dependientes.

I.2. LINFOCITOS B

I.2.1.Funciones de los linfocitos B

Los linfocitos B tienen como principal misión la de interactuar con el antígeno a través de receptores de superficie y activarse transformándose en células plasmáticas, cuya misión es segregar inmunoglobulinas (Ig) (15).

El receptor antigenico sobre la membrana de los linfocitos B lo constituyen las moléculas de Igs (16, 17). Estas moléculas de Igs presentan las regiones de interacción antigénica (centros activos) hacia el exterior, mientras que ancladas en la membrana celular están las regiones constantes, responsables de la función biológica de las Igs y del envío de señales al interior de la célula.

Según la teoría de la selección clonal, propuesta por Burnet (18), cada clon de linfocitos B posee un único receptor específico para un determinado antígeno (epitope o determinante antigénico). El inmunógeno seleccionará a aquellos clones de linfocitos B que posean Igs de superficie específicas para sus epitopes y habrá una activación celular que originará células secretoras de anticuerpo tras la interacción del inmunógeno con la célula B específica. Todas las Igs producidas por células provenientes de un mismo clon, poseen una misma especificidad antigénica que a su vez será análoga a la que tenía el receptor de membrana del linfocito B, causante de la interacción con el antígeno (19).

I.2.2. Estructura de las inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas constituidas por dos monómeros idénticos, cada uno de los cuales consta de una cadena polipeptídica denominada "pesada" (cadena H) y una cadena polipeptídica denominada "ligera" (cadena L) (20). En vertebrados superiores existen cinco isotipos diferentes de cadenas pesadas denominados: α , γ , μ , δ , y ϵ , los cuales al combinarse con las cadenas ligeras constituyen las inmunoglobulinas IgA, IgG, IgM, IgD, e IgE, respectivamente. Existen dos tipos de cadenas ligeras, las denominadas "kappa" y "lambda" (κ , λ), y estas se combinan con las cadenas pesa

das de tal modo que una molécula de inmunoglobulina puede presentar cadenas del tipo κ o del tipo λ , pero nunca las dos sobre la misma molécula (21,22).

Al comparar entre sí las secuencias de aminoácidos de un mismo tipo de cadena, se vio que estas se podían dividir en regiones constantes, que presentaban una idéntica secuencia de aa, y de regiones variables, en que la secuencia de aa variaba mucho entre cadenas de un mismo tipo. Aproximadamente, la región variable comprendía la mitad de las cadenas ligeras y una cuarta parte de las cadenas pesadas; en ambos casos comprenden unos 110 en las ligeras y 120 en las pesadas aa mas próximos al extremo N-terminal (23). Se comprobó que las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras constituían el centro activo (paratope) de unión con el antígeno (epitope). La presencia de puentes disulfuro intracatenarios originan los denominados "dominios"; los primeros de los cuales en la cadenas ligeras y pesadas comprenden las regiones variables (V_H y V_L) que contienen el paratope mientras que los demás (3 ó 4 para las cadenas pesadas y uno para las ligeras) pertenecen a las regiones constantes (C_H y C_L), en las cuales residen las propiedades efectoras de las inmunoglobulinas(24).

Las moléculas de Igs de una especie tienen propiedades antigénicas para otra especie y sus determinantes antigénicos

pueden residir tanto en la región constante (determinantes isotípicos y alotípicos) o en su región variable (determinantes idiotípicos)(24), Así, los idiotipos, estrechamente ligados al centro activo de la molécula confieren individua lidad a las Igs (25,26).

En ratones, los genes que codifican las cadenas ligeras κ , cadenas ligeras λ y las cadenas pesadas de las cadenas pesadas de las Igs, están situadas en cromosomas diferentes(27). Las cadenas pesadas están codificadas en el cromosoma 12, mien tras las κ lo están en el 6, siendo aun desconocido el grupo de ligamiento que codifica la cadena ligera λ . Sin embargo, los genes C_H de todas las posibles variedades de cadenas pesadas están muy proximately unidos sobre un único cromosoma, y esto ocurre con todas las especies estudiadas. Hoy hay tam bien evidencia del ligamiento entre los genes que codifican las regiones V y C de las cadenas de Igs, tanto ligeras como pesadas, aunque estos se encuentren separados unos de otros a nivel del DNA (28,29).

Por ultimo existen dos corrientes de pensamiento para tratar de explicar la diversidad del S.I.: La teoría de la Línea germinal según la cual en el genoma del individuo existen un gran numero de genes (V_L y V_H) capaces de codificar las especificidades frente a todos los antígenos posibles y la

teoría de la mutación somática según la cual existe un número de genes (V) menor, existiendo un mecanismo de diversidad individual que daría cuenta de la diversidad funcional del S.I. (30,31).

I.2.3. Marcadores de superficie del linfocito B

I.2.3.1. Inmunoglobulinas de superficie.

Constituyen el marcador mas característico de la estirpe celular B (32,33,34). Para la detección de las Igs de superficie se han usado diferentes técnicas, de las cuales la mas utilizada ha sido la inmunofluorescencia. El uso de antisueños anti-inmunoglobulinas fluoresceinados tiñe la superficie de las células que tengan Igs de superficie(35,36), las cuales pueden detectarse con un microscopio de fluorescencia.

Con el uso de este tipo de técnicas, se observó que cuando se teñían suspensiones de linfocitos vivos con sueros anti-Igs fluoresceinados, los linfocitos cambiaban su patrón de tinción con el tiempo, fenómeno conocido como "capping", y en el que las Igs de superficie se agrupan en un determinado polo celular. Este fenómeno representa el movimiento de las Igs sobre la superficie celular(lo que apoyaba la idea del mosaico fluido como estructura de membrana celular)(37).

La frecuencia de linfocitos con Igs de superficie varia según el órgano estudiado. Uno de los principales problemas de las primeras evaluaciones de las células con Igs de superficie, es que estos fueron hechos sin tener en cuenta el receptor Fc de la IgG que presentan ciertas subpoblaciones celulares distintas de la población B y que por lo tanto pueden unir Igs citofilicas a través de dichos receptores presentando falsas Igs de superficie. Dos grupos de investigadores (38, 39), usando diferentes técnicas para prevenir este tipo de artefactos han calculado el porcentaje de células con Igs de superficie en sangre (8-10%), bazo (27%), ganglio (23%) y timo (<1%) humanos (34).

I.2.3.2. Receptores para el complemento.

Uhr y col (40), describieron que complejos antígeno-anticuerpo-complemento eran capaces de unirse a algunos pero no a todos los linfocitos de cobaya, a través de receptores de membranas para diversos componentes del complemento. En humanos se ha detectado la presencia de un receptor para C3d, otro para C4b (41) y dos receptores independientes para distintas partes del C3b (42). Parece ser que al menos en ratón, existen células B sin receptores para el complemento; por el contrario en humanos, la mayoría de los linfocitos que tienen receptores para el complemento poseen Igs de superficie (43).

I.2.3.3. Receptores para el fragmento Fc de la IgG e IgM.

La presencia del receptor para el Fc de la IgG en las células con Igs de superficie, ha sido motivo de discrepancias entre distintos grupos de investigadores (44-46); hoy en día se tiende a pensar que a diferencia con otras poblaciones Fc positivas, los linfocitos B presentan este receptor, aunque precisarían una alta concentración de IgG sobre la superficie del hematíe para formar las rosetas(47).

Por otra parte, una mayor unanimidad de criterios parece existir entre los diversos autores respecto a la expresión del recientemente descrito receptor para el Fc de la IgM, en las células B humanas (45).

I.3 MACROFAGOS

El macrófago es el tercer tipo de célula que está íntimamente asociada al desarrollo y expresión de la respuesta inmune. A diferencia de los linfocitos T y B, los macrófagos no están ni clonalmente restringidos ni son antígeno específicos. Entre sus funciones están, la captación, metabolismo y presentación antigénica a los linfocitos T y B, la regulación de la respuesta humoral y celular bien directamente o

bien por la liberación de mediadores solubles, secreción de enzimas y factores del complemento, mecanismos de fagocitosis y pinocitosis así como su función activa en los procesos de la respuesta inflamatoria(48).

I.3.1. Marcadores del macrófago.

Los macrofagos tienen varias características y marcadores de superficie que hace que su identificación sea relativamente fácil. Quizás la más clásica de sus propiedades sea su capacidad fagocítica, con gran facilidad para ingerir una variedad de partículas marcadoras que pueden ser visualizadas luego al microscopio (partículas de latex, de hierro..etc); otra característica, es la capacidad de adherirse a la superficie del plástico o cristal, el macrofago es una célula altamente adherente y cuando esta en cultivo puede observarse como emite pseudopodos que se adhieren a la superficie del frasco de cultivo. Además el macrófago contiene gran cantidad de vacuolas (lo que también ayuda para su identificación citológica) en las que contiene gran cantidad de enzimas lisogénicos; lo que permite el uso de métodos histoquímicos para su identificación. La más empleada de estas técnicas es la de esterasas, descrita originariamente por Yan y col.(49) y modificada luego por Koski y col.(50), que permite su identificación del resto de las poblaciones celulares

Por último, otro tipo de marcadores del macrófago se encuentran también sobre otras células linfoides con lo que no son exclusivos de esta estirpe celular y por lo tanto no utilizables como marcadores de diferenciación con otras poblaciones. Entre estos están, la presencia de receptores Fc de la IgG y de receptores para diferentes componentes del complemento, C3b, C4b y C3d (51,52).

I.3.2. El macrófago y su relación con los linfocitos T y B.

Los requerimientos de los macrófagos en el desarrollo de la respuesta humoral primaria frente a antígenos T dependientes está claramente demostrada (53), mientras que frente a estos mismos antígenos pero en respuesta secundaria sus requerimientos son menores (54). Frente a los T-independientes, sin embargo no parece que los macrófagos jueguen un papel tan decisivo en el desarrollo y producción de anticuerpos, aunque esto debe ser todavía corroborado (55,56).

Los macrófagos tienen al menos dos funciones importantes en el desarrollo de la respuesta humoral a antígenos T dependientes, uno, relacionado con la presentación del antígeno a la correspondiente célula T o B de manera que la estimulación sea eficiente para que las células puedan cooperar y producir anticuerpos, y otro relacionado con el mantenimiento de

la viabilidad celular de las células en cultivo "in vitro", donde parece que el macrófago juega también un papel importante.

En la respuesta celular, esta estirpe celular tiene también un papel regulador de la respuesta, tanto en la hipersensibilidad de tipo retardado, como de otras formas de respuesta celular, tales como el cultivo mixto de linfocitos o la proliferación celular frente a antígenos y mitógenos (57-59).

El cómo es capaz de llevar a cabo esta serie de regulaciones no está por ahora totalmente definido, aunque se asocian con la propiedad del macrófago de segregar mediadores solubles reguladores de la respuesta inmune. Hoy se sabe que sustancias producidas por los macrófagos actúan en los procesos de activación de los linfocitos T, bien directamente o a través de modificaciones en la liberación de nuevas sustancias, linfoquinas, que dispararían a estas células T (60).

Por último, el macrófago tiene también un importante papel en las reacciones de tipo inflamatorio y en la resistencia del organismo a la infección por determinados microorganismos. En ambas, esta respuesta la lleva a cabo en relación con los linfocitos o a través de la liberación de sus-

tancias vasoactivas, como ciertos factores del complemento, enzimas...etc, o incluso a traves de procesos citolíticos llevados a cabo por estas propias células fagocitoides(61,62).

I.4. LINFOCITOS T

I.4.1. Características y marcadores de superficie.

El linfocito T constituye una población heterogénea de células inmunocompetentes que lleva a cabo una gran variedad de funciones inmunológicas.

Los linfocitos T poseen una serie de estructuras antigénicas propias de esta población, aunque en humanos no están completamente definidas. En el ratón, hay varios sistemas antigénicos propios del linfocito T, tales como los antígenos TL, el sistema Ly 1, Ly 2, Ly 3 y Ly 5 o el MSLA (mouse specific lymphocyte antigen)(63,64,65,66). El primer paso de diferenciación de la médula ósea al timo en un sistema murino, lo constituye la adquisición de los antígenos Thy 1 y TL. En el timo, los timocitos mas inmaduros poseen el antígeno TL, así como una alta concentración del antígeno Thy 1 y están localizados en el area cortical del timo. Una posterior maduración

y diferenciación resulta en una pérdida del antígeno TL y un descenso del antígeno Thy 1, mientras que el timocito emigra del área cortical al área medular del timo(67). Estas células del área medular, que presentan un incremento de los antígenos de histocompatibilidad H-2, representan entre el 5 al 10% del total de la población tímica y se cree que son los progenitores inmediatos de los linfocitos T periféricos (68).

En el hombre, aunque los sistemas no están tan estudiados, ha sido posible definir con el uso de heteroantisueros, y recientemente con el uso de antisueros monoclonales, algunos de los estados de diferenciación intratímicos. Los timocitos humanos poseen un antígeno equivalente al TL, denominado HTL (69) y que se pierde cuando las células emigran al exterior. Una vez aquí las células HTL negativas (HTL^-) son capaces de reaccionar con antisueros monoclonales (OKT1 ó OKT3) y éstos, a su vez, reaccionan con el 10% de células tímicas y se asocian a timocitos funcionalmente maduros y probablemente listos para su exportación al exterior (70-74).

A pesar de todo el único marcador, universalmente reconocido, de linfocitos T humanos es la capacidad que tienen dichos linfocitos de formar rosetas con hematíes de carnero (E). La presencia de dicho marcador sobre células derivadas del timo, carece hasta hoy de un significado biológico definido,

aunque nosotros, así como otros autores, estudiando alteraciones en la respuesta policlonal a mitógenos y a la producción de factores mitogénicos (TCGF), pensamos que puede tener algún tipo de relación con la posible activación de los linfocitos T. (75-78)

Este marcador, aunque presente en todas las poblaciones linfocitarias derivadas del timo, no parece que se encuentre con igual intensidad en toda la gama de linfocitos T. Dentro de éstos, podemos encontrar linfocitos con alta afinidad para el hematíe de carnero (SRBC), detectados por su capacidad de formar rosetas, incluso en malas condiciones de ensayo (29°C, y baja concentración de FCS) o aquéllos que necesitan para formar las rosetas condiciones de ensayo muy estrictas, como baja temperatura (4°C), alta relación hematíe-linfocito y alta concentración de FCS y que serían linfocitos con baja afinidad para el hematíe de carnero. (79)

I.4.2. Subpoblaciones de linfocitos T humanos.

La presencia de receptores para el fragmento Fc de las Igs, ha permitido distinguir dentro de los linfocitos T distintas subpoblaciones.

Linfocitos T_M , poseen receptores para el fragmento Fc de la IgM, y constituyen alrededor de un 70% de la población T.

Parece que comprende la mayoría de linfocitos T con alta afinidad para el SRBC y como veremos se asocian funcionalmente a células con capacidad "ayudadora". También, parece que están asociados a la presencia de un antígeno que reacciona con el anticuerpo monoclonal OKT4 (79-82)

Linfocitos T_G , con receptores para el fragmento Fc de la IgG, constituyen un 20% de la fracción T total. Parece que la mayoría de ellos pertenecen a las células T de baja afinidad para el SRBC, lo que obliga para su purificación a trabajar en condiciones óptimas en la formación de rosetas E. Estas células reaccionaban con el antisuero monoclonal OKM1, que había sido definido como un antisuero anti monocitos (83). Estos resultados y el hecho de que estas células careciesen algunas funciones propias de los linfocitos T, (tales como la respuesta a mitógenos) ha puesto en duda la existencia de esta población como perteneciente a los linfocitos T, aunque nosotros pensamos que, mientras se siga considerando el roseteo E como un marcador de las poblaciones T humanas, esta población, como tal, existe. (84)

Recientemente se han descrito también otras poblaciones linfocitarias en función de receptores para el Fc de la IgA o de la IgE (T_a y T_e): Estas poblaciones no claramente defi-

nidas constituyen un bajo porcentaje de las células T totales. Se estima que la población T_{α} constituye alrededor de un 5% de los linfocitos T circulantes; mientras que los receptores Fc IgE, además de encontrarse sobre células B, se encuentran sobre linfocitos T, algunos de los cuales pueden también poseer al mismo tiempo el receptor Fc de la IgG. (85-88)

I.4.3. Heterogeneidad funcional de los linfocitos T.

Los linfocitos T pueden clasificarse bajo un aspecto funcional en dos categorías, células reguladoras y células efectoras.

I.4.3.1. Linfocitos T reguladores.

Bajo esta denominación englobamos a aquellas células que tras la interacción con el antígeno intervienen modulando la capacidad efectora de los linfocitos T y/o B. Dentro de este gran grupo de células podemos distinguir, células que regulan positivamente la respuesta inmune y que se denominan "ayudadoras" (T_A) y aquellas que lo hacen de una manera negativa, suprimiendo o reduciendo dicha respuesta, son las células "supresoras" (T_S) (34).

- Linfocitos ayudadores (T_A): Este termino surgió por la par-

ticipación del linfocito T en la respuesta humoral a determinados antígenos (los timo-dependientes) manifestandose como una facilitación de la respuesta a anticuerpos, en términos de magnitud, clase, tipo y afinidad de los mismos. Sería la cooperación entre los linfocitos T_A y B. Posteriormente, este concepto de linfocitos T_A , se extendió al papel que juegan ciertos linfocitos en la generación de células T efectoras, tales como la generación de células T citotóxicas ...etc. Sería esta una cooperación T_A con T efectores (89-92).

Estos linfocitos T_A comprenden una población de linfocitos T, que esta bastante bien definida en el ratón como células con fenotipo $Thy\ 1^+$, $Ly\ 1^+$, $Ly\ 2,3^-$, y que comprende alrededor de un 30% de los linfocitos T periféricos. En humanos, la mayoría de los autores (93,94), coinciden al situar estos linfocitos como T_M y que reaccionan con un anticuerpo monoclonal OKT4. Sin embargo, esta población T_M , no es exclusivamente ayudadora, sino que contiene también células del tipo supresor, si se estimulan con Concanavalina A (94).

- Linfocitos T supresores (T_S): definidos como aquellos linfocitos que, bajo determinadas circunstancias, son capaces de suprimir la respuesta inmune. Este tipo de respuesta negativa fué observada primero en la producción de Igs tanto en sistemas murinos como humanos, lo que implica interacciones

entre células T_S y linfocitos B; aunque pronto aparecieron descripciones sobre la modificación de la respuesta celular lo que indicaba interacciones T_S con células efectoras (95,96). Estos sistemas fueron, exageradamente usados, para explicar muchas patologías relacionadas con el sistema inmune

En ratones, donde el sistema está mejor estudiado, la célula T_S se define, fenotípicamente, como $Thy\ 1^+$, $Ly\ 1^-$, $Ly\ 2,3^+$, aunque también han sido descritos linfocitos con el fenotipo $Ly\ 1^+$, $Ly\ 2,3^+$, como linfocitos T_S no específicos. Además, sobre las T_S han sido descritos antígenos codificados por el locus I-J de la región I del H-2 (97,98).

Por su parte en humanos, la población supresora T_S se encuentra tanto en la fracción T_G como en la T_M , aunque en esta última población parece que se encuentran células T_S tras la estimulación con la Concanavalina A (94). Todavía esta en duda si la fracción T_G necesita la interacción previa, a través de su $Fc(7S)$, para poder llevar a cabo la función supresora. (93)

I.4.3.2. Linfocitos T efectores.

Comprenden aquellos linfocitos que llevan a cabo funciones tales como: la respuesta proliferativa a aloantígenos,

respuesta citotóxica o respuesta de hipersensibilidad del tipo retardado. Las respuestas alogénicas proliferativas y citotóxicas pueden ser estudiadas "in vitro" en un cultivo mixto de linfocitos (MLR), lo que se relaciona "in vivo" con la fase de reconocimiento y rechazo de las reacciones de transplantes y de injertos (99).

- Cultivo mixto de linfocitos (MLR): el MLR fué, originariamente, descrito en 1964 por Bach y col.(100) y Bain y col.(101), e implica el cultivo "in vitro" de linfocitos de dos individuos que sean antigénicamente diferentes. En la práctica, células de un individuo (el respondedor) se incuban con células de otro individuo (el estimulador) que han sido previamente tratadas con Mitomicina C (102) o radiación (103) para prevenir su proliferación; de esta manera la respuesta es unidireccional (a diferencia de la bidireccional en caso de que las células no fueran tratadas). Comprende dos tipos de respuesta, una proliferativa, que es lo que se conoce como MLR, y otra de tipo citotóxica, denominada también linfocitotoxicidad mediada por células (CML) (99).

La respuesta proliferativa (MLR), comienza con el reconocimiento de la célula estimuladora por parte de las células respondedoras, las cuales comienzan a expandirse, siendo la

medida de este crecimiento lo que constituye el MLR. Los antígenos que reconocen las células proliferativas son, principalmente, los denominados LD ("lymphocyte determinant"), y están codificados en el HLA o H-2 del MHC. Diferencias debidas a otros antígenos como los SD, pero no LD, llevan a una débil o nula respuesta proliferativa, mientras que identidad en las regiones SD y diferencias LD, dan una fuerte respuesta (104). Esta respuesta se lleva a cabo por linfocitos T, con un fenotipo idéntico en ratón a las células ayudadoras Ly 1^+ , Ly $2,3^-$, de tal manera que serían células ayudadoras del desarrollo de las células citotóxicas Ly 1^- , Ly $2,3^+$ (responsables del otro tipo de respuesta del MLR, el CML). Por último, el número de células respondiendo en un MLR a una determinada combinación alogénica, oscila entre el 1 y el 12%, lo cual no deja de ser sorprendentemente alto comparado con el número de células reactivas a un antígeno soluble (99).

- Linfocitotoxicidad mediada por células (CML): La segunda reacción del MLR es la CML, que implica la aparición de células citotóxicas (CTL). Podemos definir los CTL como aquellos linfocitos que tienen la capacidad de matar a otras células a través de un mecanismo lítico hasta hoy desconocido. La primera fase de esta función citotóxica consiste en una aproximación de la célula efectora citotóxica a la célula

diana que, incluye el reconocimiento y unión de las mismas(105). Parece que es en este primer paso donde reside la especificidad del ataque de la célula efectora. Una segunda fase consiste en la destrucción de la célula diana por un mecanismo inespecífico y todavía desconocido.

Los linfocitos T citotóxicos son específicos, es decir, matan específicamente a las células diana contra las cuales hayan sido sensibilizados (106). La especificidad de esta reacción es mediada por receptores de superficie sobre la célula efectora CTL. Estos linfocitos aparecen "in vitro" en el MLR frente a antígenos SD, y de nuevo, combinaciones de células con idéntico SD, pero diferente LD, no originan células CTL (107). La respuesta CML, con una cinética de aparición similar a la del MLR, se lleva también a cabo por células T, aunque fenotípicamente diferentes a las responsables del MLR(En ratón, las CTL son $Ly\ 1^-$, $Ly\ 2,3^+$, Ia^- (el antígeno Ia diferencia fenotípicamente a las células citotóxicas de las supresoras, Ia^+), mientras que en humanos se asocian con aquellas poblaciones con receptores Fc(7S) o aquellas que reaccionan con los antisueros monoclonales OKT1⁺, OKT3⁺, y OKT4⁻, aunque esto debe confirmarse en posteriores estudios(107,74).

Por último, hay que mencionar un fenómeno relacionado con la actividad citotóxica CTL, conocido como "restricción

H-2", y que fué descubierto por Zinkernagel y Doherty (108). Este fenómeno consiste en que cuando activamos CTL en un MLR frente a células haptenizadas o pretratadas con virus, estas CTL solo son activas cuando la célula efectora y la célula diana presentan el mismo H-2 (la célula diana debe presentar siempre el hapteno o el virus contra el cual se haya sensibilizado). Esta homología entre la célula efectora y diana debe residir en la región SD del H-2. Este fenómeno ha planteado la necesidad de un doble reconocimiento antigénico del linfocito T efector para llevar a cabo su función citotóxica, uno a través del MHC y otro que reconocería al antígeno (hapteno, virus...etc.) asegurando así la restricción singénica en la estimulación de las células T. (68, 109, 110)

- Hipersensibilidad de tipo retardada (DTH): Es una forma de una respuesta inmune mediada por células T. Si a un individuo que esté sensibilizado a un agente infeccioso se le inyecta una pequeña cantidad de antígeno en la piel, las células de la memoria sensibilizadas se acumulan y atraen a otras células al lugar donde el antígeno ha sido inyectado, originando la aparición de una pápula visible a las 48 horas (de ahí el término retardada). Esta respuesta se lleva a cabo por linfocitos T (DTH), capaces de segregar mediadores activos que causan una acumulación de células mononucleares y basófilos, y un aumento de la permeabilidad vascular (111, 112).

I.5. LINFOCITOS "NULL"

También llamados por algunos autores "tercera población celular" (TRC) (113), se definen por la imposibilidad de atribuir a una célula determinada, alguno de los receptores de superficie o capacidad funcional típica de los linfocitos T, B, o monocitos. Se trata de una célula con morfología de linfocito, pero que carece de la capacidad de formar rosetas con SRBC (como el linfocito T), carece de Igs de superficie (como los linfocitos B), y no tiene la capacidad de fagocitar el latex o de teñirse con tinción de esterasa (como el macrofago).

Estas células, por el contrario, expresan receptores para el fragmento Fc de la IgG. Morfológicamente, con tinción de Giemsa, tienen en el citoplasma granulos azurófilos que recuerdan y se parecen a algunos linfocitos T_G . De hecho, Ferrarini y col. (114) han descrito una gran correlación entre las células "null" y T_G ; una de las principales diferencias entre ambas poblaciones celulares, es que las "null" no forman rosetas con SRBC, aunque estas diferencias son minimas al considerar que las T_G solo forman rosetas de baja afinidad y que se ha descrito por algunos autores (115,116), que las "null" pueden formar, bajo ciertas condiciones, (tales como tiempos largos de incubación, tratamiento de los hematíes con neuraminidasa) rosetas con SRBC.

I.6. CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPO O DE LECTINAS.

Otros tipos de actividades citotóxicas, independientes de la que aparece en un CML por células CTL, son aquellas cuya naturaleza, especificidad y correlación "in vivo" no están totalmente definidas. Comprenden células citotóxicas que no requieren previa inmunización y que realizan sus funciones citotóxicas reconociendo, bien directamente ciertas estructuras sobre la célula diana, como en el caso de la "citotoxicidad espontánea", o bien indirectamente a través de una molécula-puente entre la célula efectora citotóxica y su célula diana. Es el caso de la "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo" (ADCC) y de la "citotoxicidad celular mediada por lectinas" (LICC). (117)

- Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, ADCC., En este tipo de reacciones la célula efectora, conocida como célula K, es capaz de matar a células dianas que estén recubiertas de anticuerpo (79, 118, 119, 120). La célula K, tiene receptores para el fragmento Fc de la IgG a través de los cuales se une a la célula diana recubierta de IgG. Si estos receptores han sido bloqueados a través de inmunocomplejos, hay una total inhibición de la actividad citotóxica, lo que hace que el ADCC sea una de las funciones mejor conocidas

en que se requiera la presencia de células con receptores Fc(7S) intactos(121). La especificidad en la ADCC viene dada por el anticuerpo y no por la célula efectora; es decir, es la unión del anticuerpo IgG sobre la célula diana lo que da la especificidad, luego la célula K reconoce y mata inespecíficamente a toda célula diana recubierta de IgG '(122).

- Citotoxicidad celular inducida por lectinas, LICC., Es un tipo de actividad citotóxica que tampoco necesita inmunización previa y que se pone de manifiesto al enfrentar, en presencia de algunas lectinas, linfocitos con células diana (123,124,125). No todas las lectinas poseen la capacidad de inducir este tipo de actividad citotóxica, lo que induce a pensar que estas lectinas no actúan solamente como una molécula puente sino que originan algún tipo de activación celular necesaria para llevar a cabo esta citotoxicidad LICC. (126). Esta citotoxicidad es llevada a cabo, en humanos, por distintas subpoblaciones celulares algunas de las cuales pueden incluir a células efectoras citotóxicas de otros tipos de citotoxicidad, como la ADCC, la citotoxicidad espontánea (NK), o a las CTL(?). También se sabe que, en humanos, incluye a macrófagos y polimorfonucleares cuando se usa como célula diana una célula anucleada (como las eritroides) y a linfocitos T si la célula diana es nucleada (como las tumorales) (127-130).

I.7. CITOTOXICIDAD ESPONTANEA

También denominada citotoxicidad "natural" o NK. Se encuentra entre aquellas actividades citotóxicas cuya especificidad no está totalmente definida. Se puede definir como aquella actividad citotóxica que presentan linfocitos de individuos sanos, no sensibilizados, cuando se enfrentan en un sistema "in vitro" frente a ciertas células diana (ver revisión 131,132).

Los estudios sobre la actividad citotóxica espontánea surgieron cuando algunos autores trabajando con células CTL observaron una alta actividad citotóxica de los linfocitos de los individuos sanos, usados como controles, frente a dichas células tumorales (133). Comprobaron que esta actividad era constante en la mayoría de los individuos y que poseía unas características propias y diferentes de la citotoxicidad específica. Al mismo tiempo, similares observaciones fueron detectadas en sistemas murinos, lo que confirmaba la existencia de un tipo de citotoxicidad especial que fue denominada "espontánea".

I.7.1. Características de la célula efectora NK.

Uno de los principales puntos sobre los que se han enfocado los estudios de la actividad citotóxica NK, ha sido

sobre el tipo de célula que media dicha actividad. Según distintos autores, la célula efectora NK ha sido relacionada con varios tipos celulares que incluyen a linfocitos T, B, "null" o células del tipo macrófago (134,135,115,136). Lo cierto, es que la célula efectora NK, tanto en sistemas murinos como humanos, carece de un marcador de membrana específico claramente reconocido.

Muchos de los trabajos tratan de correlacionar a estas células con los linfocitos T. En sistemas murinos, el problema comenzó con la evidencia clara de que tanto en ratones timectomizados como en ratones atímicos "nude", existe esta actividad citotóxica mientras que estos ratones carecen de linfocitos T típicos(137). Sin embargo, tras estos primeros datos, Herberman y col.(138) demostraron que usando altas concentraciones de antisueros anti-T, un anti Thy 1, en presencia de complemento, era capaz de eliminar dicha actividad citotóxica NK. Así, parece que las células NK de ratón, tienen baja densidad del antígeno Thy 1, y la presencia de células con baja densidad para Thy 1, ha sido también descrita en ratones atímicos (137), las cuales parece que están relacionadas con células pre-tímicas. Por su parte, y también en sistemas murinos, ha sido descrito sobre las células NK el antígeno Ly 5, propio de las células T y timocitos, pero ausente de las células B(139). Es mas, Cantor y col.(140), pien

san que este antígeno Ly 5 contribuye, de alguna manera a la propia función inmunológica de estas células.

En humanos, algunos autores piensan que todas las células NK tienen receptores para el SRBC, aunque de baja afinidad (141). Recientemente, y confirmando estos datos, Kaplan y Callewart (142), demostraron que tratamiento con antisueros anti-T mas complemento, eliminaban virtualmente toda la actividad citotóxica NK. El uso de aloantisueros anti-T, ha sido también usado por Herberman y col. (138) con idénticos resultados; sin embargo, todos estos datos deben tomarse con cuidado, estos aloantisueros están, por lo general, poco definidos y en diferentes laboratorios y con el uso de diferentes sueros como fuente de complemento, los resultados no son totalmente superponibles. Por otro lado, recientemente, y al contrario de lo que ocurre con los aloantisueros, el uso de antisueros monoclonales contra linfocitos T, como el OKT1 ó el OKT3, no afectan a la actividad NK, mientras que el OKM1, que está dirigido contra macrófagos, elimina dicha actividad citotóxica (para otros autores (143), el OKM1, no va dirigido contra macrófagos, sino contra estructuras del receptor Fc(7S), con lo que al llevar estas células dicho marcador se eliminaría) (82,83). Todos estos datos tienden a asociar a las células NK con los linfocitos T.

En lo que si parecen estar de acuerdo la mayoría de los autores es en la ausencia de Igs de superficie sobre las células NK(144-146), ya que tratamientos con anti-inmuno globulinas no afectan a la actividad citotóxica. Sin embargo, hay trabajos esporádicos que muestran a las células NK con Igs de superficie (147), aunque estos deben tomarse con cautela, ya que pequeñas cantidades de Igs citofílicas unidas a través de los Fc, sobre las células NK pueden dar lugar a artefactos.

Tampoco parece que la célula efectora sea del tipo adherente, aunque aquí, una vez mas, hay que considerar el tipo de célula diana que se está usando, ya que Nelson y col. (148), han descrito, usando células anucleadas como diana, como el macrófago puede mediar este tipo de actividad citotóxica. Pero incluso usando células diana tumorales no adherentes, la célula del tipo fagocitoide no está totalmente descartada. En humanos, ya mencionamos como un antisuero monoclonal, el OKM1, que mata en presencia de complemento a macrófagos, es capaz de eliminar dicha actividad citotóxica. Otro problema es definir correctamente la célula "null", que para muchos autores es considerada como responsable de dicha citotoxicidad espontánea. Esta célula no-T, no-B, puede tener cierto tipo de analogías con el macrófago, con lo que de nuevo se vuelve a relacionar al macrófago con las NK. (ver revisión 114).

Uno de los marcadores que parece ser mas característico de las células NK, en todas las especies estudiadas, es la presencia del receptor Fc de la IgG (131,141, 149- 151). Este marcador es mas difícil de detectar en sistemas murinos, lo que puede significar una baja afinidad del receptor por el Fc. En humanos, donde el marcador es mas facilmente detectable, se asocia, generalmente, a todas las células efectoras NK, aunque algunos autores consideran que solo lo lleva una fracción de las mismas (152). En general, eliminando las células con receptores Fc(7S), se elimina la actividad NK (153).

Otro marcador a considerar es el receptor para el complemento. Mientras que algunos autores no han encontrado este receptor sobre las células NK(144,145,154,155), otros lo consideran como un marcador característico de estas células (151,156). Sin embargo, en humanos, hoy este marcador está mas asociado a células con Igs de superficie y no a células citotóxicas (43).

Por último, hay una serie de laboratorios que han intentado buscar la presencia de una estructura antigénica característica y propia de las células NK. Hasta ahora, y solo en sistemas murinos, se han descrito dos sistemas que reconocen especificamente a estas células efectoras. Glimcher

y col.(157) usando un aloantisuero antitímocito, vió que este reaccionaba específicamente con células NK, y fué llamado anti-NK-1. Este antisuero que en presencia de Comple₂ mataba a células NK, fué probado en diferentes laboratorios con diferentes resultados; aunque sí mataba a cierto tipo de células, la reducción de la actividad citotóxica NK nunca era total (132). Por otro lado, recientemente, diversos autores han encontrado un glicosfingolípido asociado a la membrana de las células NK, es el denominado "asialo GM1". El tratamiento con un antisuero anti-asialo GM1, era capaz de eliminar totalmente la actividad citotóxica NK (158,159).

Para finalizar la caracterización de la célula efectora NK, hay que mencionar algunos aspectos sobre la morfología de esta célula. Saskela y col.(160) usando una tinción clásica de Giemsa, comprobaron que las células que se unían a las diana K562 (célula diana sensible a NK), presentaban una morfología constante y particular, se trataba de linfocitos grandes que presentaban un núcleo con aspecto arriñonado, en cuya oquedad se observaban granulos azurófilos densos (161). Estas células denominadas LGL ("large granular lymphocyte") parece que son las responsables, al menos en parte, de la actividad citotóxica espontánea (162).

I.7.2. Especificidad de las células NK.

Ha sido siempre objeto de controversias, y actualmente se tiende a pensar en células con un amplio margen de especificidades. Se comprobó que la actividad citotóxica espontánea no posee ningún tipo de restricción a través de antígenos de histocompatibilidad y que no hay barrera especie específica; es decir, células efectoras del ratón son efectivas frente a células humanas como diana (163,164). Esta actividad NK no está tampoco restringida frente a células tumorales, así, células normales como fibroblastos, macrófagos..etc., pueden ser susceptibles de ser lisadas por NK (165).

Con el fin de encontrar contra qué tipo de estructuras iban dirigidas las células NK, se trató de localizar un antígeno común sobre todas las células diana sensibles a NK. La presencia de proteínas asociadas al virus C fue considerada en un principio aunque pronto quedó descartado. Recientemente, Hatzfeld y col.(166), han detectado la presencia de una glicoproteína, la gp70, sobre dichas células diana; es más células gp70 negativas no eran susceptibles de ser lisadas, mientras que tras la aparición de esta glicoproteína, la célula diana adquiere la susceptibilidad de ser lisada por las células NK.

1.7.3. Factores que afectan a la actividad citotóxica NK.

La actividad citotóxica espontánea puede ser aumentada o disminuida por el tratamiento con determinadas sustancias, tanto en sistemas murinos como humanos.

Entre los sistemas que reducen la actividad NK, se encuentra el tratamiento de las células efectoras con ciertas drogas como la ciclofosfamida y la hidrocortisona (167,168). Inhibidores de la síntesis de proteínas como la emetina, que no alteran la actividad NK, sí son capaces de inhibir su posible aumento por posteriores tratamientos con sustancias aumentadoras (como la poli I:C). En ratones y ratas, la actividad citotóxica es moderadamente sensible a la acción de los rayos X, aunque altas dosis originan un apreciable descenso de dicha actividad (168).

Por su parte, hay muchos estudios sobre sistemas que aumentan la actividad NK. Lo primero a destacar es el componente genético ligado a dicha actividad NK; hay cepas de ratones que poseen alta actividad citotóxica mientras que hay cepas de baja actividad (169), es más, combinaciones de cepas de baja actividad NK resultan individuos F_1 que tienen niveles normales de actividad, lo que nos indica que los genes que codifican dicha actividad son de carácter recesivo (170). En humanos, donde los sistemas están peor estudia-

dos, se observa un amplio rango de actividades entre individuos normales, lo que se puede asociar de nuevo a un componente genético.(171)

Otra cuestión a considerar, es el diferente grado de actividad en función de la edad del individuo. En ratones, la actividad es máxima entre la 5 y 8 semanas de edad, siembaja la actividad en ratones de más de 12 semanas(131).

El tratamiento de ratones con virus o adyuvantes inmunológicos como el BCG ("Bacillus-Calmette-Guerin) o el "Corynebacterium parvum" causan un rápido incremento de la actividad NK (172-174). Cuando se estudió que este mismo incremento ocurría también tras la inoculación con "poli I:C", un fuerte inductor del interferón (INF), se comenzó a considerar al propio I como causante directo del aumento en la actividad citotóxica (175). Se descubrió, como tras la inoculación "in vivo", en sistemas murinos, de INF, este era capaz de inducir un fuerte aumento de la actividad citotóxica NK; este efector era anulado tras la inyección de un antisuero anti-INF, lo que demostraba un efecto directo del INF sobre dicha actividad NK. Ultimamente, ensayos también "in vivo", han demostrado como, tanto en ratones normales como atímicos, hay un aumento de los niveles de INF en la sangre de los ra-

tones cuando estos son inoculados, tanto con células tumorales como con ciertos virus, lo que parece indicar que el INF puede jugar un papel importante "in vivo" en el desarrollo de la actividad citotóxica espontánea (176,177,178,179). Por último, un similar aumento de la actividad NK, fué observado en ensayos "in vitro" cuando los linfocitos eran preincubados con INF (180-182).

I.7.3.1 El Interferon

Fué en 1957 cuando Issacs y Lindeman (183) definieron a una sustancia, el interferón, como capaz de conferir protección a membranas en cultivo, del ataque de ciertos virus; así, el I fué definido como una sustancia antiviral. Posteriores estudios, comprobaron que existían una familia de interferones y que todos eran glicoproteínas(184). Estos tipos pueden ser clasificados en base a sus diferentes especificidades antigenicas, tipos designados como INF- α (alfa); INF- β (beta) e INF- γ (gamma), y que correspondían a la designación previa de INF de leucocitos (Le); INF de fibroblastos (F) (estos dos tipos a su vez clasificados como INF tipo I ó "clasico") e INF tipo II ó inmune, respectivamente(185). Los INF- α y β son usualmente acido-estables, a diferencia del INF- γ que es acido-labil(se destruye a pH 2)(184).

Los estudios sobre el INF han sido enfocados en una doble vertiente, por un lado los estudios sobre su aislamiento, purificación y genética, y por otro lado su papel e importancia biológica. Con respecto al primer punto, recientemente, el uso de antisueros monoclonales ha permitido la purificación de grandes cantidades de INF, y a su vez su empleo y secuenciación; además, estudios usando ingeniería genética han permitido la localización de una gran variedad de genes que codifican el INF (185,186), alguno de los cuales han sido clonados, construyendo cepas de bacterias que conteniendo estos genes, pueden producir INF (187) activo biológicamente (188).

Por otro lado, el papel biológico del INF ha sido tremendamente impulsado, no solo por su importante misión antiviral, sino por los recientes estudios que otorgan al INF un importante papel anti-tumoral(189). En su relación con el sistema inmune, el INF presenta dos facetas opuestas; a) una actividad inmunosupresora, tanto en la producción de anticuerpos (ya sean para antígenos timo dependientes como timo independientes) como en la inhibición de la respuesta a mitógenos tanto de T como de B, y b) una actividad aumentadora de todo tipo de actividades citotóxicas, tanto específicas (CTL), como NK ó ADCC.(190)

1.7.4. Papel biológico de las células NK.

Uno de los principales papeles que se atribuyen a las células NK es la de ser la célula responsable de la "vigilancia inmunológica". Este término acuñado por Erlich (191), inicialmente, y ampliado por Burnet (192), sugiere la idea de un control interno sobre las células que pueden alterarse espontáneamente y transformarse en células neoplásicas. Siempre, según la hipótesis, ciertas células circulantes destruirían a aquellas otras que se transformasen en células de tipo tumoral, mientras que los tumores aparecerían cuando las células origen de los mismos escapasen de esta vigilancia inmunológica. Pronto se atribuyó a los linfocitos T la capacidad de llevar a cabo este fenómeno, aunque el hecho de que los ratones atímicos ("nude") no tuvieran una mayor incidencia en desarrollar tumores espontáneos parecía que eliminaba esta posibilidad. Sin embargo, con los estudios sobre citotóxicidad espontánea, en los que los ratones atímicos presentaban esta actividad NK, surge la idea de la célula NK como responsable de este fenómeno. Estudios en los que híbridos F_1 de ratones deficientes en células T, pero con alta actividad NK, resisten el crecimiento de tumores transplantados, mejor que aquellos con baja actividad NK, favorece esta hipótesis. Además, en estudios con ratones deficientes en actividad NK, los ratones "beige", se comprobó un aumento en la velocidad

de crecimiento, una inducción mas rápida y un mayor aumento en las metastasis de tumores sólidos transplantados, así como una mas baja resistencia a leucemias inducidas transplantadas en estos ratones comparados frente a ratones control. Todos estos experimentos sugieren un importante papel de las células NK en el control y desarrollo de ciertos sistemas tumorales. (193-197)

Estos ratones "beige", que tienen una mutación en el cromosoma 13, con una baja o nula actividad NK, tienen su equivalente humano en el síndrome de "Chédiak -Higashi". Pacientes con este tipo de desórdenes presentan también una baja actividad citotóxica NK y ADCC (198-200) y suelen cursar con ciertos desórdenes proliferativos que pueden ser malignos (200) lo que de nuevo relaciona, en humanos, la deficiencia de las células NK con una mayor incidencia en enfermedades tumorales malignas.

Por último, mencionar el papel del INF como agente anti-tumoral y su relación con las células NK. El INF que, en si mismo, es un potente citostático, ejerce, como vimos, ciertas acciones sobre el S.I. y principalmente sobre la NK; no solo activandolas, sino alterando y aumentando el rango de especificidades frente a un mayor numero de células tumorales lo que permite una mayor defensa contra los sistemas tumorales.

II. MATERIALES Y REACTIVOS

II.1. MATERIAL PARA CULTIVOS CELULARES

- Placas esteriles de cultivo de 96 pocillos fondo U
- Frascos esteriles de cultivo de 25 cm².
- Frascos esteriles de cultivo de 250 cm².
- Placas de Petri 10 x 35 mm.

pertenecientes indistintamente a las siguientes casas:

- * Falcon Oxnard, Ca. USA.
- * Sterilin. Teddington, Inglaterra.
- * Nunc. Dinamarca.
- * Costar. Cambridge, Ma. USA.
- * Greiner. Soria-Greiner. Madrid. España.
- Colector de sobrenadantes de cultivo. SKATRON AS. Flow.
Flow Lab. Lierbyen. Noruega.
- Colector de sobrenadantes. TITERTEK.
Flow Lab. Irvine. USA.
- Camara de flujo laminar.
Telstar SA. Tarrasa. España.
- Estufa de cultivo de CO₂. Forma Scientific. Marietta. USA.
- Contador Gama 4000. Beckman Ins. Inc. Irvine. Ca. USA

II.2. REACTIVOS

- Medio RPMI 1640. Microbiological Associates. Md. USA.
- L-Glutamina. Flow Lab., Irvine. USA.
- Penicilina-Estreptomicina. Difco Lab. Detroit. Mi. USA.
- Medio MEM Autopow. Flow Lab. Irvine. USA.
- Suero Bovino fetal. Gibco. Grand Island. NY. USA.
- Lymphoprep. Ficoll-Hypaque. d.1077. Nyegaard&Co. Oslo. Noruega.
- HEPES 1M. Flow Lab. Irvine. USA.
- Fitoheماغlutinina. Difco Lab. Detroit, Mi. USA.
- Poli-L-lisina. No. Cat. 1886. Sigma. St. Louis. Mo. USA.
- Percoll. T.M. Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala. Suecia.
- Antisueros antiinmunoglobulinas totales fluoresceinados.
Operon. Zaragoza. España.
- Antisueros antihemáticos bovinos IgG.
Cappel Lab. Inc. Cochranville. Pa. USA.
- Antisueros antihemáticos bovinos IgM
Cappel Lab Inc. Cochranville. Pa. USA.
- AET. Sigma. St. Louis. Mo. USA.
- Cromato sodico. ⁵¹Cr. Amerhsam. Inglaterra.
- Hanks medio. Difco Lab. Detroit. Mi. USA.
- Medio TC 199. Difco Lab. Detroit. Mi. USA.
- Bactolatex. Difco Lab. Detroit. Mi. USA.

- Heparina. Laboratorio Leo. Madrid. España.
- Giemsa. Merck Lab. Darmstadt. Alemania.
- Solución de Pararosanilina. Sigma . No. 3750. St.Louis. USA.
- Solución de -naftil butirato. Sigma. St. Louis. Mo. USA.
- Dimetil Formamida. Merck. Darstadt. Alemania.
- Verde Metilo. Fisher. No. 76110. USA.
- Azul Tripan. Fluka. AG. Chemische Fabrick, CH-9470. Buchs.SG.

II.3. PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

En el presente trabajo se han utilizado los siguientes medios de cultivo:

1) RPMI 1640, suplementado con distintas concentraciones de suero bovino fetal (FCS), glutamina 2mM, HEPES 10mM, 100 U.I. de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Al medio así preparado lo denominaremos "RPMI completo".

2) MEM autopow., esterilizado en autoclave al que se le añadió glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, 100 U.I. de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Según los diferentes sistemas empleados, diferentes concentraciones de FCS fueron empleadas. Al medio así preparado se denominó MEM-FCS.

II.4. LINEAS TUMORALES

Las diferentes líneas tumorales usadas en este trabajo (Tabla 1) fueron mantenidas, in vitro por pases sucesivos con medio de cultivo RPMI completo con el 10% de FCS, en frascos de cultivo de plástico y mantenidos en estufa a 37°C con el 5% de CO₂.

La línea P815, mastocitoma de DBA/2, fué mantenida en forma ascítica por pases semanales de 1×10^7 células en la cavidad peritoneal de ratones singénicos DBA/2. La línea de rata (C58NT)D, leucemia inducida por el virus Gross, fué donada generosamente por

TABLA 1

LINEAS TUMORALES EMPLEADAS

NOMBRE	MANTENIDAS EN:	SENSIBILIDAD NK	ORIGEN
K562	"in vitro"	+ + + +	Leucemia Mieloide
E-14	"in vitro"	+ + +	
CHANG	"in vitro" (*)	+	Cel. Hepatica
HSB	"in vitro"	+	Carcinoma de vejiga
ALAB	"in vitro" (*)	+	Cancer de mama
G-11	"in vitro" (*)	+	Cancer de mama
MOLT-4	"in vitro"	+ + +	Leucemia LLA.Tipo T
T-24	"in vitro" (*)	+	Carcinoma de vejiga
P815	"in vivo" (DBA/2)	-	Mastocitoma de ratón

(*) Lineas tumorales adherentes al plastico.

el Dr R. B. Herberman y mantenida en forma ascítica en ratas Wistar/Furth.

Las células eran recogidas, bien del frasco de cultivo, bien de la cavidad peritoneal con suero salino, lavadas dos veces con MEM y transferidas de nuevo a un frasco de cultivo para mantener su crecimiento ó usadas en el ensayo como células diana.

Cuando las células crecían adherentes al plástico, han de ser tratadas con una solución de tripsina. El método en síntesis es el siguiente: Se quita el medio de cultivo del frasco, se lava con 2 ml de una solución al 0.25% de tripsina en 0.01 M de citrato, dejándose por espacio de 1 a 2 min. en estufa a 37°C, tras lo cual se agita la botella de forma que se vayan desprendiendo las células. Se añade 2 ml de FCS, con el fin de neutralizar la acción digestiva de la tripsina y todo se pasa a un tubo. Tras dos lavados con medio MEM-FCS a 1000 rpm se resuspenden en RPMI completo con el 10% de FCS.

II.5. ANIMALES USADOS

Se utilizaron ratones de la cepa congénica DBA/2 de 8-16 semanas, que fueron obtenidos de Charles River Breeding Lab. Mo.. Ratas singénicas Wistar/Furth fueron obtenidas de Microbiological Associates Md. USA.

II.6. PREPARACION DE LAS CELULAS LINFOIDES

Se obtuvieron a partir de los siguientes organos linfoides:
Bazo, amigdalas, timo y sangre periferica.

Celulas del timo fueron obtenidas de pacientes jovenes operados a corazon abierto. Las amigdalas fueron obtenidas en pacientes jovenes tras amigdalotomia. En estos casos fueron siempre rechazadas aquellas amigdalas de aspecto muy inflamado o purulentas. En estos casos, las celulas se dispersan en suero salino, descartandose el sedimento depositado a 1x g durante 5 min.. La suspension celular asi obtenida, se lavó tres veces con suero salino a 4°C y se resuspendieron finalmente en el medio de cultivo apropiado.

Linfocitos de sangre periferica (PBL), fueron obtenidos siguiendo el metodo de Boyum y col(201) de sangre heparinizada de donantes voluntarios sanos. Treinta mililitros de sangre diluida con igual volumen de suero salino fué puesta en tubos Falcon-50 ml lentamente sobre 10 ml de Lymphoprep (Ficoll-Hypaque) y centrifugada a 1700 rpm durante 40 min. En el tubo queda, al finalizar la centrifugación, una interfase celular conteniendo principalmente los linfocitos y un sedimento donde se depositan los hematies. La interfase celular se lava dos veces con MEM y se resuspenden en el medio de cultivo. Un 90-95% de las celulas eran viables (por tinción con un colorante vital, Azul Tripan) y consistia en 80-90% de

MARCADORES DE SUPERFICIE DE CELULAS DE SANGRE

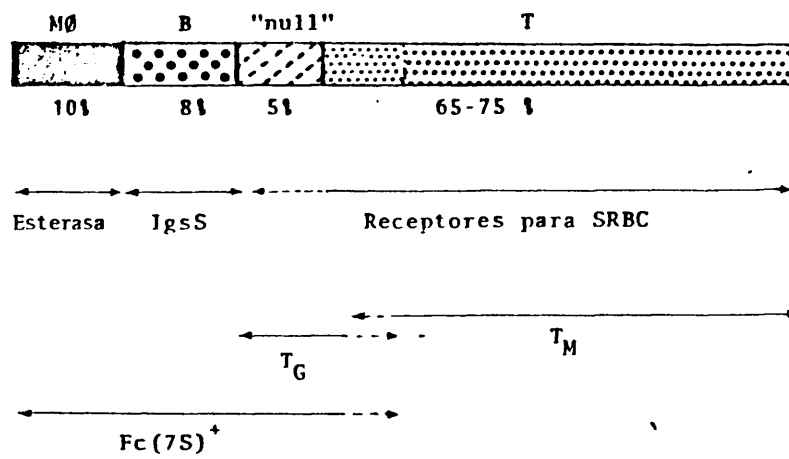


Figura 2

linfocitos, 10-15% de monocitos-macrofagos y un 1-2% de células plasmocitomorfonucleares.

Las células del bazo fueron obtenidas tras su dispersión en medio de cultivo, pasadas a través de un gradiente de Ficoll y siguiendo luego el mismo método que el empleado para los linfocitos de sangre periférica.

II.7. ELIMINACIÓN PARCIAL DE CÉLULAS ADHERENTES

Pertenecen principalmente a las células del tipo monocito-macrofago y algo, pero menos, a las células linfoides B.

II.7.1. Por pase a través de columnas de nylon.

Según el método de Berke y cols (202). Seiscientos miligramos de fibra de Nylon (Leukopack) pretratado con una solución 1 N de CLH, fue lavada repetidamente con un tampón fosfato (PBS) hasta recuperar el pH 7.3. Luego incorporada a una jeringa de 15x50 mm, e incubada a 37°C durante 30 min.. 20-25x10⁶ linfocitos fueron añadidos a la jeringa conteniendo el Nylon caliente e incubada por 1 h. a 37°C. Las células no-adherentes fueron eluidas con exceso de medio y lavadas dos veces. La recuperación celular era aproximadamente de un 50%.

II.7.2 Tratamiento con polvos de hierro.

1 mg/ml de polvo de hierro, fué añadido a la sangre total heparinizada, e incubada por media hora a 37°C. Luego la sangre es diluida y pasada por el Ficoll siguiendo el mismo sistema que para la sangre sin tratar. Las células que hubiesen captado las partículas de hierro, así como el hierro en suspensión, irán al sedimento con los hematíes, mientras que en la interfase quedaran aquellas células que no hayan fagocitado el polvo de hierro. Como control, se puede pasar un potente imán sobre la solución celular con el fin de eliminar las posibles partículas que se hayan podido recoger con la interfase.

Ambos métodos, el pase a través de columnas de nylon 6 el tratamiento con polvo de hierro, eliminan en mayor o menor grado células adherentes, aunque en ningún caso la eliminación es total, encontrando una contaminación de células con tinción de esterasas entre un 2-3% tras el empleo de cualquiera de estas técnicas.

II.8. MARCADORES DE SUPERFICIE DE LAS DISTINTAS POBLACIONES LINFOCITARIAS.

II.8.1. Detección de células con receptores para el hematíe de carnero

En 1972. Jondal y col(203) describieron la capacidad que

tienen los linfocitos humanos de formar rosetas de una manera espontánea con hematíes de carnero (SRBC o E); esta propiedad ha permitido identificar a la población linfocitaria procesada por el timo.

Nosotros hemos generalmente empleado la unión directa, sin ningún tipo de tratamiento, de los linfocitos con los hematíes E, usando una alta proporción de FCS, 40%, y una relación de 100:1 de eritrocitos-linfocitos. Linfocitos más eritrocitos se centrifugan y el sedimento se mantiene a 4°C durante una hora; luego se resuspenden con mucho cuidado y se calcula el porcentaje de linfocitos rodeados de hematíes (roseta) por conteo de al menos 200 linfocitos en una cámara de conteo Neubauer. Se consideran rosetas, linfocitos con más de tres hematíes. Para una mejor lectura a la hora de contar las rosetas, se le añade unas gotas de naranja de acridina (colorante que tiñe fluorescente el núcleo celular) y se cuenta en un microscópico de fluorescencia.

Modificaciones en la temperatura y en los tiempos de incubación llevan a una variación en el número de rosetas apareciendo como hemos visto en la Introducción términos como "linfocitos de alta densidad" o "linfocitos de baja densidad". Con la técnica descrita arriba, se forman las rosetas con linfocitos tanto de alta como de baja afinidad.

Con el fin de potenciar la estabilidad de las rosetas, pueden emplearse en algunas ocasiones la formación de rosetas con eritrocitos tratados con AET (2-aminoetil-isotio-
uranio bromuro hidrobromuro). El procedimiento en detalle es el siguiente:(204)

- 1600 mg de AET se disuelven en 15 ml de agua destilada; el pH se lleva a 8,2 con NaOH al 50%. A continuación este volumen se lleva a 20 ml con agua destilada; esta solución AET por no ser muy estable debe usarse en 30 min.

- Tratamiento de los hematíes de carnero con AET: 4 volúmenes de la solución AET, pH 8,2, se mezclan con un volumen de hematíes apelmazados, manteniéndose la mezcla en un baño a 37° durante 20 min. con agitación ocasional. Las células se lavan 4-5 veces con MEM hasta que se observa lisis de los hematíes. Estos se resuspenden entonces al 2% en MEM y se guardan a 4°C (pueden ser utilizados hasta pasados 5 días).

- Formación de rosetas: 0,1 ml de células (10×10^6 /ml) se mezclan con 0,1 ml de los AET al 2%; se centrifugan a continuación a 1000 rpm y se dejan durante una hora a 4°C. El sedimento es entonces resuspendido contándose el número de rosetas al microscopio.

II.8.2. Detección de células con inmunoglobulinas de superficie.

Para la identificación de las células portadoras de inmunoglobulina de superficie, 0,05 ml de un antisuero fluoresceinado de cabra anti-inmunoglobulina humana se añade a 0,2 ml de la suspensión celular (5×10^6 células/ml) a ensayar; tras 45 minutos de incubación, a 4°C para evitar el "capping", se lava 3 veces a 4°C, 1400 rpm durante 10 min., con 1 ml de Hanks y al sedimento resuspendido se le añade una gota de una mezcla glicerina-Hanks al 50%, leyéndose a continuación en un microscópio de fluorescencia.

II.8.3. Detección de las células con receptores para el fragmento Fc de la IgG.

El número de células con este receptor es valorado contabilizando el número de células capaces de formar rosetas con hematíes de buey sensibilizados con inmunoglobulinas anti-buey (7S-EA). Para ello, hemos empleado el procedimiento descrito por Moretta y col. (84): una suspensión al 5% de hematíes de buey frescos se mezcla con un volumen igual de una dilución al 1/32 de IgG anti-hematíes de buey obtenida en conejo.

El anti-suero ha de añadirse gota a gota agitando; a continuación se incuba esta mezcla a 30°C durante 15 min. y tras tres lavados a 2000 rpm, 5 min. a 4°C, se resuspenden los 7S-EA al 2,5%. 0,1 ml de linfocitos (3×10^6 /ml) se mezclan con 0,1 de la mezcla 7S-EA, se centrifugan durante 5 min. a 4°C y 1200 rpm, tras lo cual, se incuban durante 30 min. y se cuenta el número de rosetas en un microscopio de fluorescencia, añadiendo una gota de naranja de acridina al sedimento resuspendido.

II.8.4. Detección de células con receptores para el Fc de la IgM.

En 1975, Moretta y col. (80) describieron la presencia de este tipo de receptores en una subpoblación de células T humanas, y más recientemente ha sido demostrada su existencia en células B (45).

Este receptor permanece oculto en la superficie de los linfocitos recién extraídos y sólo es posible su detección tras incubación a 37°C en atmósfera de CO₂ por un tiempo de 18 horas. Nosotros hemos seguido el procedimiento de Moretta, el cual incubaba durante toda la noche una mezcla formada por 0,1 ml de células (10×10^6 células/ml), 0,2 ml de FCS y 0,7 ml

de medio TC 199, glutamina y Hepes. Tras la incubación, las células se lavan en medio TC 199 y se resuspenden a 3×10^6 células/ml, mezclándose a continuación 0,1 ml de estas células preincubadas con 0,1 ml de la mezcla EA-19S.

Esta mezcla, EA-19S, era preparada incubando hematíes frescos de buey al 2% con un volumen igual de una dilución 1/16 de un antisuero de conejo IgM (19S), con actividad anti-hematíe de buey. La incubación tiene que realizarse a 4°C durante 30 min., tras lo cual se lava 3 veces con PBS a 2000 rpm, 5 min. a 4°C, resuspendiéndose el sedimento en PBS al 0,5%.

Una vez realizada la mezcla, linfocitos-EA-19S, se centrifugan 5 min. a 4°C, 1200 rpm, y se pone en hielo durante 45 min., leyéndose en un microscopio de fluorescencia tras la adición de una gota de naranja de acridina. Dado que estas rosetas EA-19S son tremendamente frágiles, ha de evitarse tras la incubación en hielo toda manipulación violenta que las haga romperse.

II.8.5. Detección de células capaces de ingerir partículas de Latex.

Las células fagocíticas de la estirpe monocito-macró-

fago, son capaces de ingerir bolas de Latex, levaduras, partículas de hierro, etc., que quedan incluidas en las vacuolas citoplasmáticas y por tanto pueden visualizarse mediante el uso de un microscopio o de autoradiografía.

Nosotros hemos empleado la técnica de las partículas de Latex para distinguir a estas células fagocíticas. Para ello, 2×10^6 células en 1 ml de RPMI-10% FCS se incuban con 10λ de Bactolates a 37°C durante 2 horas. Se lavan repetidamente para eliminar el Latex no fagocitado, y a continuación se cuentan en un microscopio el número de células que presentan esferas en el interior de su citoplasma.

II.8.6. Tinción de esterasas inespecíficas para la identificación de monocitos y macrófagos.

El alto contenido en enzimas lisosómicos de los monocitos y macrófagos, ha permitido emplear una serie de técnicas histoquímicas para la detección de esta población leucocitaria. Nosotros hemos empleado la tinción de esterasas inespecíficas según el método descrito por Koski y col. (50). Para ello, se realizan extensiones de la suspensión celular cuyo contenido en macrófagos se quiere determinar (conviene que las células estén en presencia de suero para obtener una mejor morfología).

Las extensiones se fijan durante 30 min. sumergiéndolas en líquido fijador, tras lo cual se lavan 4 veces en agua destilada y se secan al aire durante 30 min. A continuación, se sumergen en una solución (formada por 45 ml de tampón fosfato M/15 de Sorensen, 0,25 ml de una solución de para-rosanili_na hexazohizada v/v con nitrato sódico al 4%, y 3 ml de una solución de alfa-naftil-butilato), poniéndose en un baño a 37°C durante 45 min.; nuevamente se lavan cuidadosamente con agua destilada y se tiñen con una solución al 0,5% de verde metilo como solución de contraste. Finalmente, se secan al aire durante 30 min. y se miran al microscopio. Las células que contiene esterasas se distinguen fácilmente por la presencia de múltiples gránulos rojos en el citoplasma, lo que contrasta con el color verde de las células esterasa negativas.

II.9. SEPARACION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA EN SUS DIFERENTES SUBPOBLACIONES.

II.9.1. En función de los marcadores de superficie.

II.9.1.1. Preparación de linfocitos T y no T.

Fue seguida una modificación del método de Dean y col. (205). Linfocitos humanos fueron resuspendidos en medio RPMI completo. La suspensión celular (1×10^6 células/ml) conteniendo una media de 40×10^6 células fueron mezcladas con hematíes de carnero frescos en una proporción de 100:1, en 40% de FCS; centrifugado a 1200 rpm durante 5 min., e incubado durante una hora a 4°C en hielo picado. Después de una sua-ve resuspensión del sedimento, las rosetas fueron separadas en un gradiente de Ficoll (1200 rpm durante 30 min.). Las células formando rosetas (E-RFC) quedan en el sedimento, mientras que en la interfase se encuentran los linfocitos que no forman rosetas (no E-RFC). La interfase se recoge y tras resuspender suavemente el sedimento sobre medio fresco, se cuenta el porcentaje de rosetas de cada fracción. Para obte-ner un mayor enriquecimiento, cada fracción fue roseteada de nuevo con SRBC siguiendo los mismos pasos que los descritos arriba. Al final del segundo pase, el sedimento contenía entre el 91-97% de células E-RFC (linfocitos T) y la interfase 0-2% E-RFC (células no T). Los hematíes formando rosetas fueron soltados de las células T por tratamiento del segundo se-dimento con 2 ml de una mezcla de varios sueros humanos fres-cos e incubados 30 min. a 37°C siguiendo el método de Pellegrino y col. (206). Las células son lavadas dos veces en medio RPMI y resuspendidas luego a la concentración deseada.

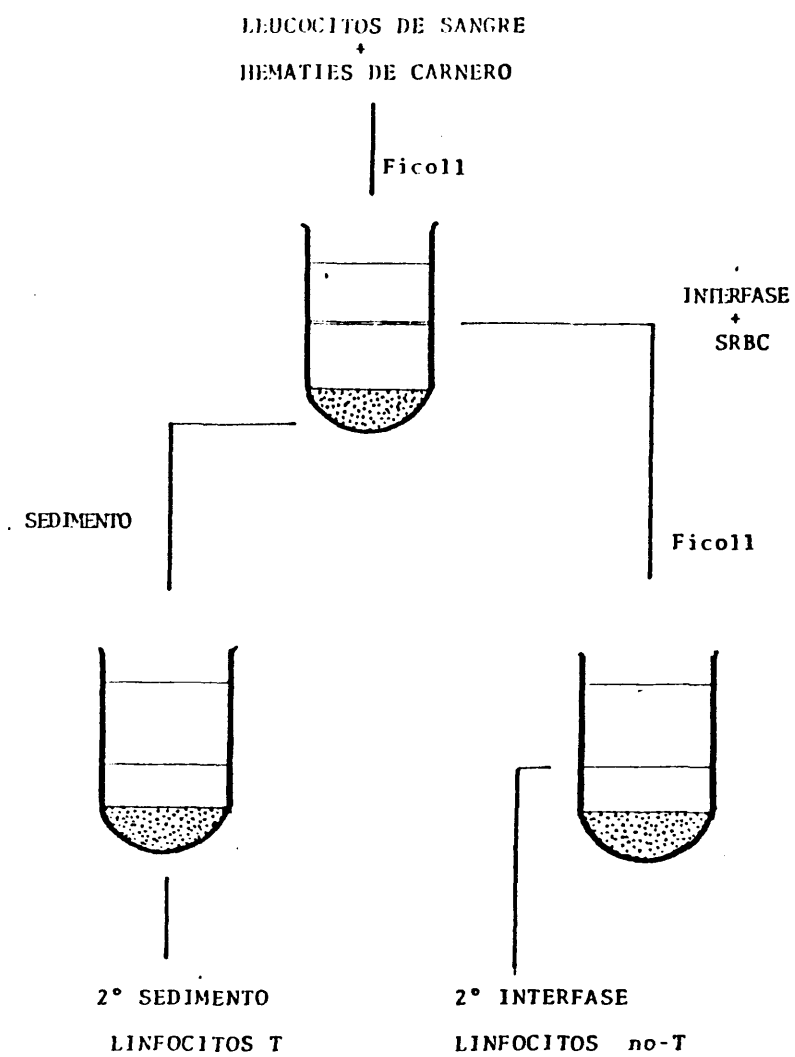


Figura 3

II.9.1.2. Preparación de linfocitos T gamma (T_G) y T mu
(no T_G).

Linfocitos obtenidos tras dos pases por Ficoll con SRBC según el método anteriormente descrito, fueron roseteados con hematíes de buey recubiertos de anticuerpos 7S (EA-7S) para obtener linfocitos T_G o no T_G , siguiendo el método descrito por Ferrarini y col. (64). EA-7S fueron preparados sensibilizando una suspensión del 5% v/v de hematíes de buey a 37°C durante 20 min. con un volumen igual de una dilución en PBS 1:32 de un antisuero de conejo IgG anti-hematíes de buey que tenía una concentración de proteína final de 2 mg/ml.

Para formar las rosetas, 3,6 ml de la suspensión al 2,5% v/v de EA-7S) fue mezclado en un tubo cónico de 50 ml con $30-40 \times 10^6$ de células en un volumen total de 40 ml de medio RPMI completo con un 10% de FCS; centrifugado a 1200 rpm durante 5 min. a temperatura ambiente e incubado luego a 37°C durante media hora. Después de la incubación el sedimento fue suavemente resuspendido, 10 ml de Ficoll fueron inyectadas al fondo del tubo y las células que están roseteadas (T_G) separadas de las no roseteadas (no T_G) tras la centrifugación a 1400 rpm, 10°C durante 35 min. La interfase y el sedimento fueron resus-

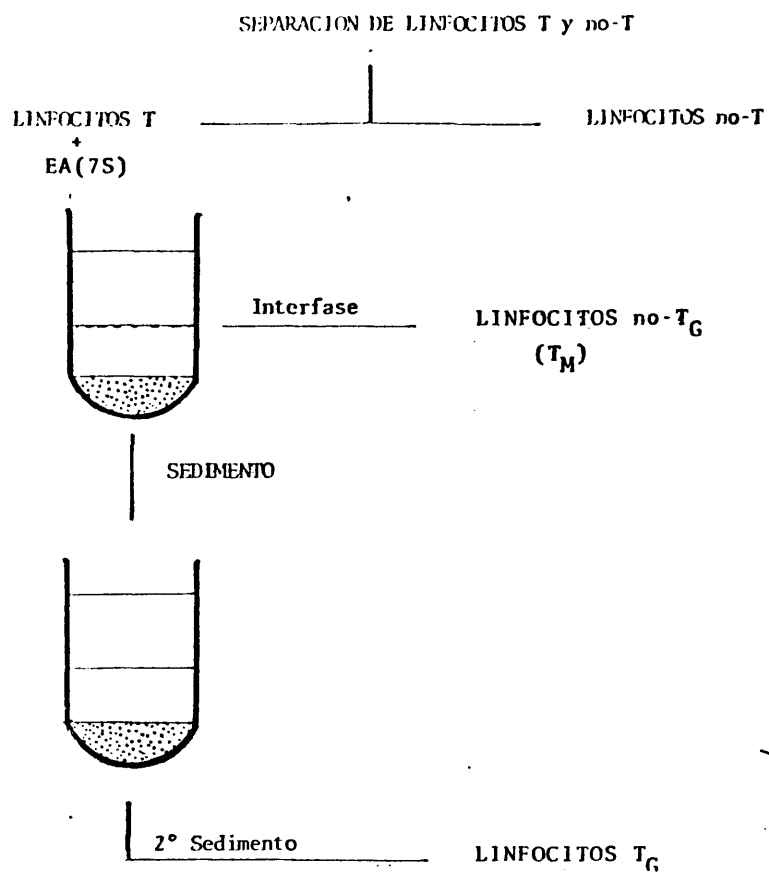


Figura 4

pendidos y el numero de rosetas EA(7S) contadas. Para obtener un mayor enriquecimiento en células T_G , el sedimento fué pasado de nuevo por un segundo gradiente de Ficoll, durante 30 min. a 37°C.; el sedimento es resuspendido, contado el numero de rosetas y las células liberadas de los hematíes de buey por incubación con suero humano normal tal como se ha descrito previamente. La interfase del primer pase por Ficoll constituye la población no T_G , y el sedimento del segundo pase forma la población T_G .

11.9.1.3. Preparación de células $Fc(7S)^+$ y células $Fc(7s)^-$

20 ml de una suspensión de sangre periférica conteniendo 40×10^6 de células en RPMI completo con 10% de FCS, fueron mezclados con 3.6 ml de una suspensión al 2.5% de hematíes de buey sensibilizados con una IgG de conejo anti-hematíes de buey. La mezcla fué centrifugada a 1200 rpm durante 5 min. a temperatura ambiente y posteriormente incubado a 37°C durante 30 min. Tras este tiempo, se resuspende el sedimento y 10 ml de Ficoll son inyectados al fondo del tubo; este se centrifuga a 1450 rpm durante 20 min. a temperatura ambiente. La interfase (no $Fc(7S)$) y el sedimento ($Fc(7S)^+$) son resuspendidos y se calcula el porcentaje de rosetas. Para obtener una mayor pureza, el sedimento fué pasado una segunda vez por Ficoll y las células del

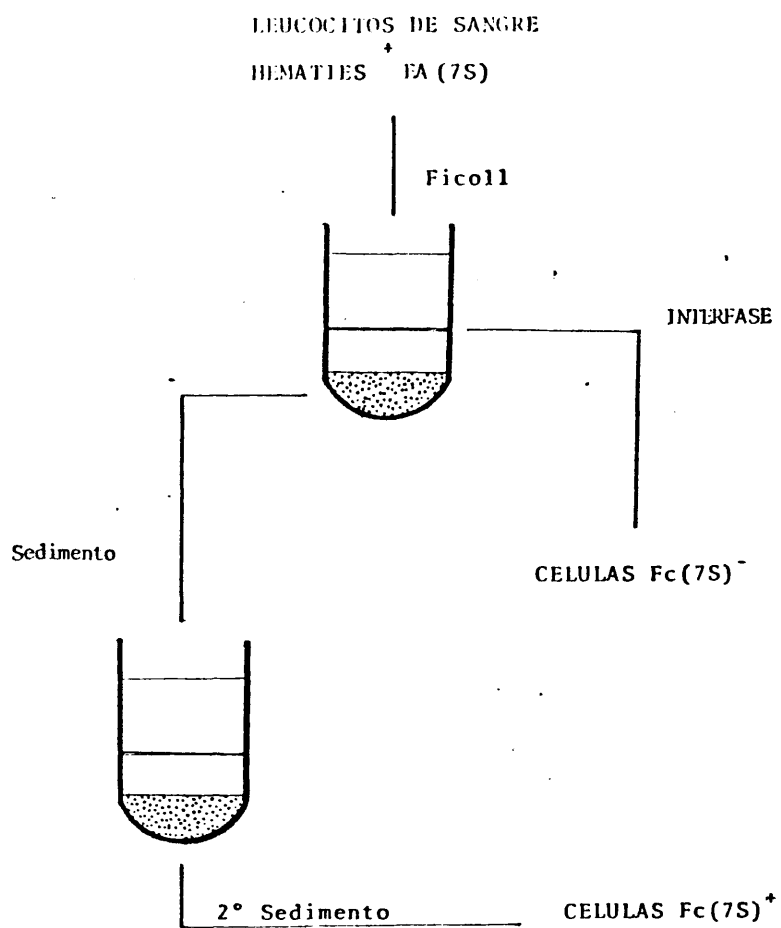


Figura 5

segundo sedimento consideradas como las células $\text{Fc}(7\text{S})^+$. De nuevo los hematies lisados por la incubación del sedimento con suero humano fresco, 30 min. a 37°C , lavando luego la suspensión en suero salino y resuspendiéndolas en el medio apropiado: Esto constituye la población $\text{Fc}(7\text{S})^+$ y la interfase del primer pase por Ficoll constituye las células no- $\text{Fc}(7\text{S})$ ó $\text{Fc}(7\text{S})^-$.

II.9.2. En función de su tamaño y densidad en un gradiente discontinuo de Percoll.

Leucocitos humanos, desprovistos de células adherentes, por pase a través de una columna de nylon, fueron separados por centrifugación sobre un gradiente discontinuo de Percoll (207).

La solución base, de la cual parten las demás soluciones para formar el gradiente, consistía en 92 partes de Percoll puro (comercial) y 8 partes de una solución 10 veces concentrada de un buffer fosfato (PBS) pH 7.4. A partir de aquí, se prepararon siete diferentes concentraciones de Percoll en medio RPMI completo con 10% de FCS. Estas preparaciones contenían el 40% (fracción 1), 43.3% (fr. 2), 45.8% (fr. 3), 48.3% (fr. 4), 50.3% (fr. 5), 53.3% (fr. 6) y 66.6% (fr. 7) de la solución base de Percoll. Después de poner cuidadosamente el gradiente en un tubo de cristal de 15 ml, se añadieron sobre el mismo $5-7 \times 10^7$ células en 1 ml, y el tubo fue centrifugado

a temperatura ambiente a 3000 rpm durante 5 min. Las células de las diferentes fracciones fueron recojidas con una pipeta Pasteur y lavadas en medio RPMI con 10% de FCS. La recuperación total de las células era de un 80% y con una viabilidad detectada por Azul Tripan de un 95%.

II.10. MONOCAPAS CELULARES PARA INMUNOADSORCION

II.10.1. Formación de la monocapa.

1 ml de poli-L-lisina ((PLL) peso molecular 30.000, 50 µg/ml en PBS) fué añadido a cada placa Petri de plástico de poliestireno de 35x10 mm. Después de una hora a temperatura ambiente, las placas fueron lavadas tres veces en un vaso de precipitado con PBS (pH 7.3) para eliminar la PLL no unida al plástico y se añadió 1 ml de una solución al 1% v/v de hematíes de pollo (CRBC), que habían sido previamente lavados en PBS. Tras 60 min de incubación a temperatura ambiente, las placas fueron lavadas tres veces en PBS para eliminar los CRBC sobrantes que no se habían adherido. Luego, las placas se incuban 10 min con 0.2% de glutaraldehído (GA) en PBS, seguido de lavado y de una segunda incubación de 10 min con 0.1 M de glicina en PBS (208). Las monocapas de hematies fueron lavadas con PBS y almacenadas a 4°C hasta su uso.(209) ,

Antes de volver a usar las placas con los hematíes, se lavaron en PBS, luego se les añade 1 ml de una solución 1/50 de PHA y se incuban durante 30 min a 37°C en atmosfera de CO₂. Al final de la incubación, las placas se lavan tres veces en PBS para eliminar la PHA sobrante, con lo que nos queda una película de PHA unida a la monocapa de hematíes. Sobre esta se añaden ahora entre 25-30x10⁶ células diana en 1 ml de medio, se incuban durante media hora a 37°C y se lavan de nuevo para eliminar las células que no se hayan adherido. Finalmente, 1 ml de una suspensión al 1% v/v de hematíes humanos fueron añadidos para cubrir los intersticios que pudiesen quedar entre las células diana formando las monocapas, evitando así las adsorciones inespecíficas, e incubados a 37°C durante media hora, lavados en PBS y usados para adsorber las células citotóxicas.

II.10.2. Adsorción de células efectoras sobre monocapas celulares.

1 ml de células efectoras conteniendo alrededor de 5x10⁶ células/ml en medio RPMI completo con el 10% de FCS, fueron añadidos a las monocapas y después de una suave agitación incubados durante diferentes periodos de tiempo a 37°C. Luego, las placas son vigorosamente agitadas durante 10 seg con el fin de soltar las células no adherentes y el medio con células en suspensión es recogido. Se lavan las células dos veces en

medio fresco y se usan en el ensayo citotóxico.

II.11. ENSAYO CITOTÓXICO POR SUELTA DE ^{51}Cr .

II.11.1. Marcaje con el isótopo ^{51}Cr de las células diana.

$1-2 \times 10^6$ células diana se ponen en un tubo en 0.1ml de volumen, con 0,1 ml de FCS y 150 μCi de cromato sódico (^{51}Cr). Esta mezcla se pone en estufa a 37°C por espacio de una hora con agitación ocasional. A continuación se lavan 2 veces con MEM-FCS 10%, a 1000 rpm y 4°C , tras lo cual se resuspenden en MEM-FCS 10% suplementado con 1% de glutamina.

Cuando se cromaban las células diana a utilizar en ADCC, se añadía a la mezcla Chang-FCS- ^{51}Cr , 0,1 ml de un anti-suero anti Chang obtenido en conejo. Procediéndose después de la incubación igual que con otras células diana.

II.11.2. Preparación de las células efectoras y procedimiento.

Los linfocitos a utilizar en los ensayos citotóxicos se lavan repetidamente a 1000 rpm con medio MEM-FCS 10%, y se resuspendían a la concentración deseada en MEM-FCS .

5×10^3 células diana marcadas con ^{51}Cr fueron mezcladas con las células efectoras en distintas proporciones efec- "

tora/diana (100:1 a 6:1), en 0,2 ml de medio MEM+10% de FCS. El ensayo fué hecho, bien en tubo de cristal de 12x75 mm ó bien en placas de cultivo de 96 pocillos.

En los experimentos de LICC, se añadía a la mezcla de células efectoras-diana diluciones de la lectina PHA obtenida del laboratorio Wellcome.

Todos los experimentos de citotoxicidad se realizarón durante un tiempo de 4-6 horas de incubación a 37°C y atmósfera de carbónico (5% CO₂). Tras este periodo de tiempo, se añadía a cada tubo 1 ml de una solución salina fría con el fin de detener la reacción. A continuación, los tubos eran centrifugados 5 min a 1500 rpm y los sobrenadantes eran decantados sobre otros tubos de 12x75 mm, determinándose en ellos la liberación del isótopo radioactivo en un contador ganma. En caso de usar la placa de 96 pocillos, se utilizaba un sistema semiautomático de recojida de sobrenadantes. Un filtro encajaba en cada uno de los 96 pocillos, tras el cual una fibra absorbía el sobrenadante que era luego contado en un contador ganma. Todas estas combinaciones ensayadas eran realizadas por triplicado. Siempre incluíamos en los distintos experimentos, controles en los que en lugar de células efectoras se añadían células autólogas a la diana cromada. Esto permitía medir la suelta espontánea de isótopo de las células diana, que solía

oscilar entre un 10-15% del total de isotopo incorporado por las células. El porcentaje de citotoxicidad se calculaba de acuerdo con la siguiente formula:

$$\% = \frac{(A-B) - (C-B)}{(T-B)} \times 100$$

en la que A= cpm de la media de los tubos problema

B= cpm fondo del contador

C= cpm del control con células autólogas a la diana

T= maxima liberación de isotopo, obtenida por acción de un detergente sobre las células diana.

Para calcular el % de citotoxicidad en los ensayos de ADCC y LICC, teniamos que sustraer el % de lisis obtenido en ausencia de lectina o de anticuerpo, es decir, la citotoxicidad espontanea.

En ocasiones, la actividad citotoxica era expresada en Unidades Liticas (U.L.). Una unidad lítica se define como el numero de linfocitos requeridos para obtener un 30% de lisis, a un numero fijo de células diana (en nuestro caso 5×10^3) y un determinado tiempo de incubación. Se determina representando los valores de la citotoxicidad especifica frente a la relación de células efectora:diana, este valor representado en

escala logaritmica, usando para ello un papel semilogaritmico. Hay una curva lineal entre los valores del 20 y 60% de lisis, zona esta donde se determinan las U.L.. Usando este valor, se puede calcular el numero de U.L. presente en 10^6 a 10^7 células.

En ensayos de competición, se siguió una modificación del metodo de Landazuri y Herberman (210). Brevemente se siguió el siguiente protocolo: La inhibición fué llevada a cabo en tubo de cristal de 12x75 mm colocados en posición horizontal, y nunca en las placas de 96 pocillos, para evitar la inhibición inespecifica que puede originar el gran numero de células frias usadas como inhibidoras. 5×10^3 células diana maracadas con ^{51}Cr , fueron incubadas con $2,5 \times 10^5$ linfocitos en 1 ml de medio en los tubos de cristal. A esta mezcla se añadieron diferentes cantidades de células no marcadas radioactivamente (células frias) (desde 5×10^3 hasta 36×10^3) variando la relación de células frias a marcadas de 1:1 hasta 7:1, con una proporción final de células efectora: células diana totales (suma de frias mas marcadas) de 25:1 a 6:1. Los tubos fueron incubados durante 4 horas a 37°C en $5\% \text{CO}_2$ sobre una plataforma móvil. Después se siguió el metodo descrito anteriormente. En todos los experimentos de inhibición empleamos como controles positivos, o bien K562 no marcado o bien Chang-anticuerpo, para los ensayos NK y ADCC.

II.12. TECNICA DE FORMACION DE CONJUGADOS

Hemos seguido una modificación del método de Grim y Bonavida (211).

2.5×10^5 células efectoras e igual numero de células diana fueron centrifugadas en un tubo de cristal de 12x75 mm a 1000 rpm, durante 5 min., incubados luego durante 10 min a 37°C. Todo el medio, excepto un volumen aproximado de 0.3 ml es aspirado, el sedimento es ahora resuspendido violentamente por pipeteo repetido con una pipeta Pateur y la suspensión celular contada en un hemocitometro Neubauer. Un conjugado se define como una célula efectora (linfocito) unida a una célula tumoral (de mayor tamaño). Se calcula ahora el porcentaje de conjugados sobre 200 linfocitos.

II.13. TECNICA DE CONJUGADOS CITOTOXICOS EN AGAROSA

Esta tecnica fué ensayada siguiendo el método de Grim y Bonavida (211).

Se basa en la formación de conjugados entre la célula efectora y la célula diana. Una vez formados los conjugados, tal como se describe en el apartado anterior, se le añade a los

misimos ya en suspensión, 1,5 ml de agarosa al 1% fundida. Esta agarosa al 1% se prepara anteriormente en medio RPMI, calentandose luego a una temperatura de 42°C, donde se fundirá; antes de añadirla a la suspensión celular de conjugados conviene enfriarla ligeramente por repetidos pipeteos. Alicuotas de 0,5ml de las células en agarosa son rapidamente repartidas en placas de Petri de 35 x 100 mm antes de que la agarosa se solidifique. Despues de que la agarosa se haya solidificado, 1 ml de medio RPMI completo con 10% de FCS se añade lentamente a la placa, para evitar que la agarosa se seque durante el posterior periodo de incubación.

Las placas son incubadas en estufa de CO₂ durante determinados periodos de tiempo. Tras cada periodo de incubación, las placas son sacadas del incubador, el medio aspirado y se le añade ahora 1 ml de Azul Tripan. Despues de 5 min el colorante se recoge lavando luego las placas dos veces con MEM. Al final 1 ml de formaldehido se añade para fijar las células. Contaremos, el porcentaje de células que forman conjugados en los cuales el linfocito haya matado a su célula diana (conjugados citotoxicos) que aparecera ahora teñida de azul y el porcentaje de conjugados totales.

II.14. TRATAMIENTO DE LOS LINFOCITOS CON INTERFERON

Hemos ensayado dos tipos de Interferones (INF), un INF de fibroblastos, regalo del Dr. R. Herberman y un INF de leucocitos regalo del Dr B. Bonavida, ambos provenientes del Institute of Allergy and Infectious Disease, NIH, con una actividad de 20.000 U./ml.

En ensayos de citotoxicidad de conjugados citotóxicos (Resultados III.3.2.) el INF provenia de leucocitos humanos y usamos un rango de dosis entre 5 y 20 U. de INF. En ensayos de citotoxicidad por liberación de ^{51}Cr , usamos INF de fibroblastos con un rango de dosis de 100 a 1000 U./ml.

1 ml conteniendo 5×10^6 células es incubado con distintas concentraciones de INF, durante un periodo de tiempo variable (ver Resultados). Luego las células eran lavadas con un medio fresco y ensayadas en el ensayo citotóxico.

III. RESULTADOS

III.1. CARACTERIZACION DE LA CELULA EFECTORA EN CITOTOXICIDAD ESPONTANEA.

Para estudiar y caracterizar la célula que media la citotoxicidad espontánea (NK), usamos principalmente linfocitos de sangre periférica de donantes voluntarios sanos purificados por el método de Boyum y col. en un gradiente de Ficoll (201).

III.1.1. Formación de conjugados en las diferentes subpoblaciones linfocitarias.

El primer paso en la lisis de una célula tumoral es el reconocimiento y la unión de la célula efectora con la célula diana (211). Este paso se realiza rápidamente y puede ser visualizado al microscopio óptico como la formación de un conjugado, que comprende una célula pequeña linfoide unida a una célula tumoral.

Lo primero que observamos fue que el número de conjugados de linfocitos de sangre periférica variaba ligeramente según la célula diana usada. Como vemos en la Tabla 3, alrededor de un 10% de linfocitos de sangre periférica formaban conjugados con la línea K562, mientras que se veían alrededor de un 6% de

TABLA 3

FORMACION DE CONJUGADOS DE LINFOCITOS CON CELULAS TUMORALES

CELULA DIANA	PORCENTAJE DE CONJUGADOS
K562 *	11.2 \pm 1.4
MOLT-4 *	5.7 \pm 0.2
G-11 **	6.8 \pm 4.8
CHANG **	5.8 \pm 3.1

* media de 10 experimentos

* media de 6 experimentos. En estos casos, dado que las células eran adherentes es muy difícil evaluar el porcentaje real de conjugados, de ahí la gran variabilidad entre los diferentes experimentos.

conjugados usando la línea MOLT-4 o la G-11.

Dado que la formación de conjugados constituye un primer paso para la lisis celular, era interesante tratar de caracterizar qué subpoblación de linfocitos de sangre periférica era capaz de formar dichos conjugados, lo que nos acercaría a conocer en qué fracción se hayan las células efectoras en actividad citotóxica espontánea.

Para ello separamos los linfocitos en:

- a) células con receptores para el hematíe de carnero (linfocito T) o células que no poseían este receptor (linfocito no T). Estas poblaciones fueron obtenidas tras dos pases secuenciales de purificación con rosetas E(SRBC) a través de un gradiente de Ficoll (vease esquema Fig. 3);
- b) células que tuviesen receptores para el fragmento Fc de la IgG (Fc(7S)⁺) o células que no tuviesen ese receptor (no Fc(7S)). Esta separación se lleva a cabo por un roseteo con hematíes de buey sensibilizados con anticuerpos IgG (EA-7S) y separados a través de un gradiente de Ficoll. La primera interfase constituye la población no Fc(7S), mientras que el sedimento se vuelve a pasar a través de un gradiente de Ficoll y su sedimento constituye la población Fc(7S)⁺ (vease esquema Fig. 5).

Linfocitos totales o pertenecientes a cada una de estas fracciones, fueron usados para formar conjugados con la línea más sensible a la actividad NK, la línea K562. En la Tabla 4, vemos que aproximadamente la célula que forma conjugados con K562 está repartida en la misma proporción entre los linfocitos T y no T (aprox. 11%), mientras que la mayoría pertenecen a la fracción $Fc(7S)^+$ (aprox. 25%), con algunos conjugados en la fracción no $Fc(7S)$ (<4%).

Ya que encontramos conjugados en la fracción no T, estudiamos si las células con inmunoglobulinas de superficie (linfocito B) formaban conjugados. Para ello, sobre linfocitos marcados con un antisuero antiinmunoglobulinas humanas- fluorescente, se hicieron conjugados con K562. Como se muestra en la Tabla 5, ninguna de las células formando conjugados se teñían con el antisuero ni viceversa, con lo que demostramos que los linfocitos B no forman conjugados con las células diana NK.

Del mismo modo, los macrófagos son contaminantes de la fracción no T y poseen receptores $Fc(7S)$. Al enriquecer en células con receptores $Fc(7S)$, el macrófago también se encontraría enriquecido en dichas poblaciones, con lo que era necesario comprobar si este tipo celular forma parte o no de las células que forman conjugados.

TABLA 4

PORCENTAJE DE CONJUGADOS EN DISTINTAS FRACCIONES LINFOCITARIAS

Población celular *	% Conjugados **	% de células con receptores	
		E	Fc(7S)
Leucocitos totales	11.2 \pm 1	72.0 \pm 4	27.7 \pm 2
Células T	11.3 \pm 1.5	95.2 \pm 6	12.4 \pm 3
Células no T	12.3 \pm 1.1	2.5 \pm 0.8	38.2 \pm 6
Células Fc(7S) ⁺	27.5 \pm 2.1	27.7 \pm 2	79.9 \pm 4
Células Fc(7S) ⁻	3.2 \pm 0.5	79.4 \pm 5	2.0 \pm 1

* Leucocitos totales no adherentes fueron separados en base a la presencia de receptores para SRBC o para el Fc(7S) en, células T, no T, Fc(7S)⁺ y Fc(7S)⁻, respectivamente.

** Células totales o cada una de las fracciones fueron usadas para formar conjugados con la línea K562.

TABLA 5

LAS CELULAS QUE FORMAN CONJUGADOS NO POSEEN IgS DE SUPERFICIE

MARCADORES	EXP. 1	EXP. 2	EXP. 3	EXP. 4
Células con Igs de superficie [*]	6	9	10	12
Células formando conjugados ^{**}	10	11	13	16
Células formando conjugados ^{***} que lleven Igs de superficie	0	0	0	0

* Células de sangre fueron incubadas con antiinmunoglobulinas fluoresceinadas y el numero de células teñidas evaluado sobre 200 células.

** La células diana fué la K562

*** Células previamente teñidas con antiIgs totales fueron usadas para formar conjugados con K562. Se calculo en la preparación el porcentaje de células teñidas con Igs de superficie *, el porcentaje de células formando conjugados **, y células con ambos marcadores ***.

Para comprobar esto, nos basamos en la identificación citológica de los macrófagos usando la tinción de esterasa. Esta tinción claramente visible al microscopio y propia de los macrófagos (50), nos permitía diferenciar a la célula formando el conjugado. Como se ve en la Tabla 6, alrededor de un 13% de macrófagos son contaminantes de los linfocitos totales; al comprobar los conjugados vemos que sólo un 1% del 11% de células totales que forman conjugados tienen tinción de esterasa.

Con todos estos resultados podemos descartar a los linfocitos B como células causantes de la formación de conjugados. Los macrófagos aunque en pequeño porcentaje (aprox. 10%) forman conjugados, y aunque estos no tengan demasiada importancia al evaluar células totales de sangre periférica, en la cual la contaminación de macrófagos es de un 10%, debe tenerse en cuenta cuando enriquezemos poblaciones por el receptor Fc(7S), y en las cuales los macrófagos se encuentran en mayor proporción. Por lo tanto, la única fracción que nos queda y que mayoritariamente formará los conjugados, será la población "null", células que además poseen receptores Fc(7S).

Para corroborar los resultados de la separación de las poblaciones celulares, quisimos comprobar qué tipo de marcador presentaba la célula efectora en el momento de estar formando el conjugado; esto es, la detección simultánea del conjugado y de

TABLA 6

No. DE CELULAS FORMANDO CONJUGADOS CON TINCION DE ESTERASA

MARCADORES	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4
Células con tinción de esterasa	13	16	15	13
Células formando conjugados	11	12.5	12.5	10.9
Células formando conjugados que se tiñen con esterasas	1	1.2	1.2	1.1

* Células de sangre formando conjugados son fijadas en un porta y teñidas por tinción de esterasas; luego se cuentan el porcentaje de células teñidas, formando conjugados y con ambos marcadores a la vez.

diferentes marcadores del linfocito por formación de rosetas del tipo E, EA(7S) o EA(19S).

En la Tabla 7 vemos como las células que hacen conjugados: a) la mitad de ellas forman rosetas E mientras que la otra mitad carece de dicho receptor; b) la mayoría forman rosetas EA(7S), indicándonos de nuevo la presencia del receptor Fc(7S) en estas células y c) casi todas ellas carecen de receptores para el fragmento Fc(19S).

Tomados en conjunto todos estos datos y los anteriormente citados, nos aproximamos al definir a la célula que forma conjugados como célula $\text{Fc}(7\text{S})^+$ siendo la mitad del tipo T (E^+) y la otra mitad del tipo "null" (no T, no B, $\text{Fc}(7\text{S})^+$).

III.1.2. Actividad citotóxica de las diferentes subpoblaciones linfocitarias.

III.1.2.a. Estudio de diferentes subpoblaciones de sangre periférica.

Aunque ya poseemos cierta información sobre cuál es el tipo de células que forman conjugados, los propios conjugados no constituyen en sí la célula efectora NK. Además, recientes

TABLA 7

DOBLES MARCADORES DE SUPERFICIE : CONJUGADOS K562 Y ROSETAS

PBL + K562 *	adicion de:		
	E	EA(7S)	EA(19S)
Linfocitos solos	12.5 ± 1	75.3 ± 5	23.6 ± 10
Linfocitos + rosetas	73.3 ± 8	15.6 ± 3	65.0 ± 19
Linfocitos + K562 + rosetas	6.6 ± 1	8.5 ± 2	0.8 ± 0.5
Linfocitos + rosetas	6.3 ± 1	2.5 ± 0.5	12.6 ± 6

* Los numeros representan el porcentaje de la media de 5 diferentes experimentos (ds). Los linfocitos se usaron para formar conjugados con K562, luego se incubaron con E, EA(7S) ó EA(19S) y se resuspendieron, contandose en 300 células el numero de linfocitos solos, formando conjugados o con ambos marcadores.

datos de otros autores han demostrado (162) que no todos los linfocitos formadores de conjugados poseen capacidad citotóxica. Por ello, era indispensable estudiar bajo un aspecto citotóxico la localización de la célula efectora NK. Para ello, células de sangre periférica purificadas en un Ficoll, se subdividieron en las diferentes fracciones de acuerdo con los diferentes marcadores de superficie que poseen (vease Fig. 2).

Poblaciones celulares enriquecidas en linfocitos T y no-T, fueron obtenidas tras dos pases secuenciales de purificación con rosetas E a través de un gradiente de Ficoll (vease Fig. 3). De acuerdo con los datos de Moretta y col. (84), las células T humanas pueden subdividirse en dos subpoblaciones en base a la presencia de receptores para el fragmento Fc de la IgG en linfocitos T_G y linfocitos T_M (Fig. 4). Para ello, linfocitos T fueron roseteados con hematíes de buey recubiertos de anticuerpo IgG, EA(7S) y separados en un gradiente de Ficoll. La primera interfase constituía la población no T_G (o T_M), mientras que el sedimento tras un nuevo gradiente de Ficoll constituía la población T_G .

Por otro lado, leucocitos totales fueron separados de acuerdo con la presencia o no de receptores Fc(7S) en células $Fc(7S)^+$ o células no $Fc(7S)$. Esta separación celular se reali-

za del mismo modo que el descrito previamente (Fig. 5).

En la Tabla 8, indicamos un detallado estudio de los marcadores de superficie más importantes de las distintas subpoblaciones linfocitarias estudiadas.

Leucocitos sin purificar o cada una de las fracciones obtenidas (T_G , T_M , $Fc(7S)^+$ o no $Fc(7S)$) fueron incubadas en diferentes proporciones con células diana K562 marcadas radioactivamente con ^{51}Cr en un ensayo citotóxico de 4 horas de duración.

Dado que las células que forman conjugados son $Fc(7S)^+$, nosotros ensayamos primero la actividad citotóxica de poblaciones $Fc(7S)^+$ y no $Fc(7S)$. En un experimento representativo se observa una normal actividad citotóxica de la población con células $Fc(7S)^+$, mientras que hay una ausencia total de dicha actividad en la fracción no $Fc(7S)$ (Fig. 6). Otros tres experimentos presentan el mismo patrón de actividades.

Por su parte en la Fig. 7 vemos el resultado de un experimento tipo en el que se muestra la actividad citotóxica de los linfocitos totales o de sus diferentes subpoblaciones: linfocitos T, células no T, linfocitos T_G y linfocitos no T_G . Como podemos observar, todas las fracciones ensayadas tienen actividad citotóxica menos las células no T_G , destacando una mar-

TABLA 8

MARCADORES DE SUPERFICIE DE LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES CELULARES DE SANGRE

POBLACION	% E	% Fc(7S) ⁺	% Fc(19S) ⁺	% ESTERASAS	% IgSS.
SANGRE TOTAL	56.0 ± 8	25.3 ± 2	49.7 ± 12	13.5 ± 5	12.0 ± 4
LINFOCITOS T	94.4 ± 4	12.2 ± 3	60.8 ± 12	2.5 ± 1	0.2 ± 1
LINFOCITOS no T	1.6 ± 1	50.1 ± 9	29.6 ± 13	44.5 ± 7	41.6 ± 5
LINFOCITOS T _G	96.4 ± 6	91.7 ± 3	23.7 ± 6	3.0 ± 1	NR
LINFOCITOS no T _G	91.5 ± 5	0.8 ± 1	70.1 ± 7	0.5 ± 1	NR
CELULAS Fc(7S) ⁺	27.7 ± 2	79.9 ± 4	NR	39.4 ± 9	NR
CELULAS Fc(7S) ⁻	79.4 ± 5	1.5 ± 0.5	NR	2.0 ± 1	NR

* En 8 diferentes experimentos, leucocitos de sangre fueron separados en sus diferentes fracciones en base a sus marcadores de superficie. Los números representan la media (D.S.) de los 8 experimentos

∞
∞

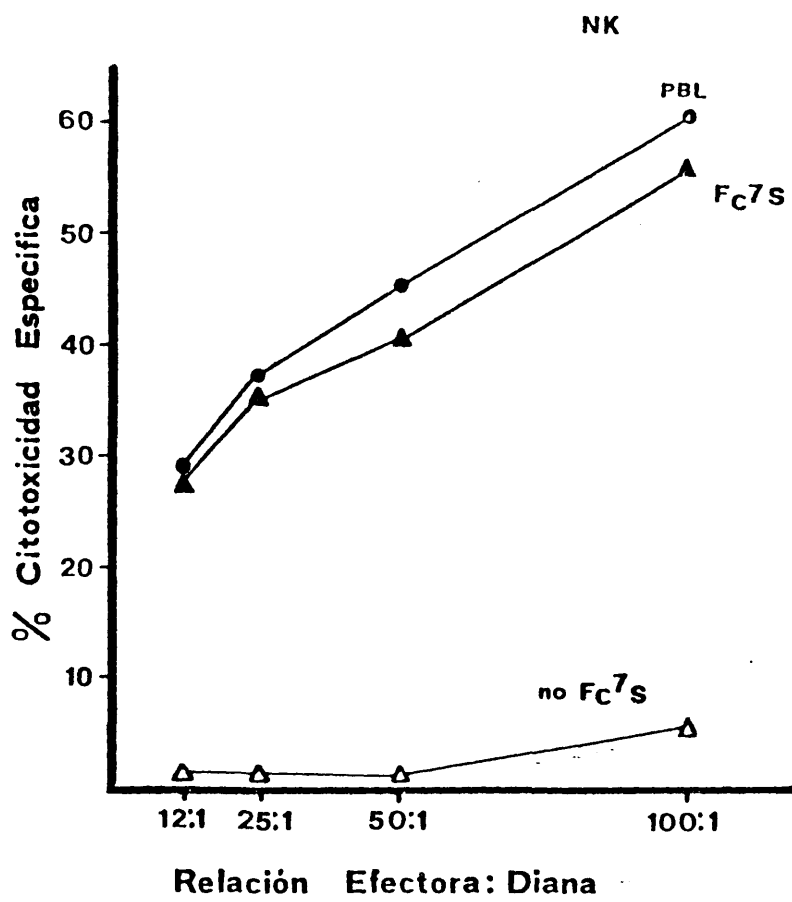


Figura 6

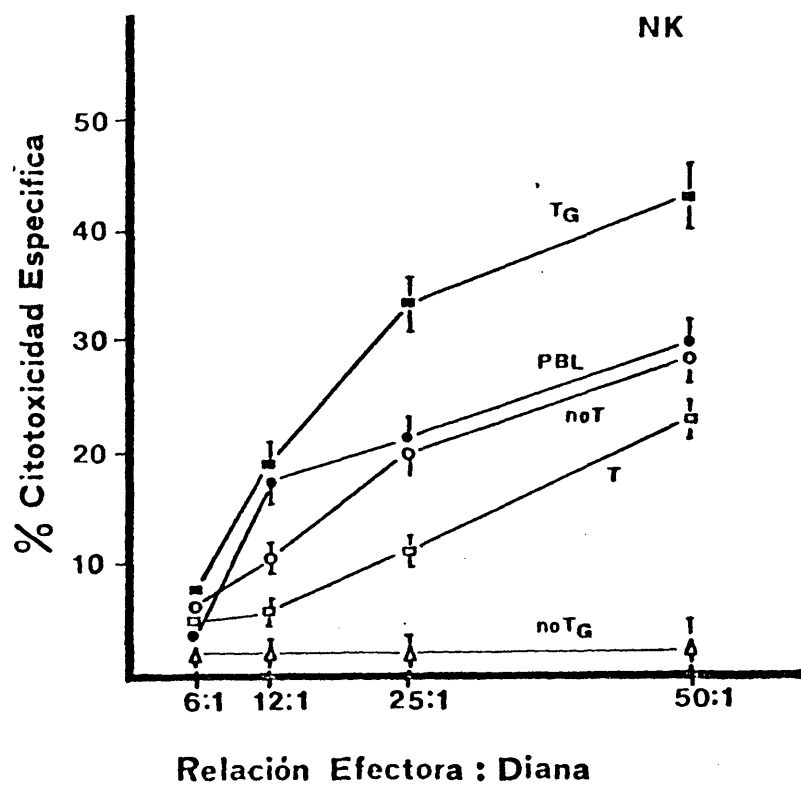


Figura 7

cada actividad de los linfocitos T_G . Cuatro adicionales experimentos mostraron un mismo patrón de citotoxicidad en todas las subpoblaciones estudiadas.

Todos estos experimentos nos indican que la actividad NK está mediada por células con receptores Fc(7S) ya que las poblaciones que tienen estas células median actividad citotóxica contra K562, mientras que células desprovistas de células con receptores Fc(7S) carecen de dicha actividad NK. Además, las células efectoras se reparten entre la población T y no T, y dentro de la población de linfocitos T, sólo la T_G lleva a cabo esta actividad citotóxica. Como habíamos visto, que dentro de la población no T las células B, con inmunoglobulinas de superficie, no forman conjugados con la K562, nos indicaría que las células efectoras en esta población no T serían las células "null", células que además se encuentran entre la población celular con receptores Fc(7S). Resumiendo, hasta ahora las células que llevan a cabo la actividad citotóxica NK, pertenecen a poblaciones de linfocitos T_G y linfocitos "null".

Finalmente, comprobamos que la ausencia de actividad citotóxica espontánea en las fracciones no T_G era debido a la ausencia de células efectoras citotóxicas y no a otros sistemas como fallo en el mecanismo lítico o mala viabilidad de las células en estas poblaciones.

Para ello, ensayamos la citotoxicidad de las mismas en otro sistema citotóxico en el que se induce dicha actividad citotóxica a través de un puente que proporciona una lectina (PHA, por ejemplo) y que se sabe que está mediada por otras diferentes células efectoras. Es la actividad celular mediada por lectinas (LICC). En la Fig. 8, vemos un experimento representativo en el que hemos usado PHA como lectina y células Chang como células diana marcadas radioactivamente. Todas las fracciones usadas incluida la no T_G poseen actividad citotóxica en el LICC, lo que prueba que la ausencia de citotoxicidad espontánea no es un artefacto, sino que es debido a la ausencia de células efectoras mediadoras de citotoxicidad espontánea.

III.1.2.b. Citotoxicidad espontánea en diferentes órganos linfoides.

Como se ve en la Tabla 9, hay una gran variación en las células con diferentes marcadores de superficie que constituyen los diferentes órganos linfoides humanos. Una vez comprobado que la célula efectora en NK es una célula con receptores Fc(γS), quisimos comprobar si diferentes órganos linfoides con alto o bajo porcentaje de células con dichos receptores se correlacionaba con la presencia o ausencia de actividad citotóxica espontánea.

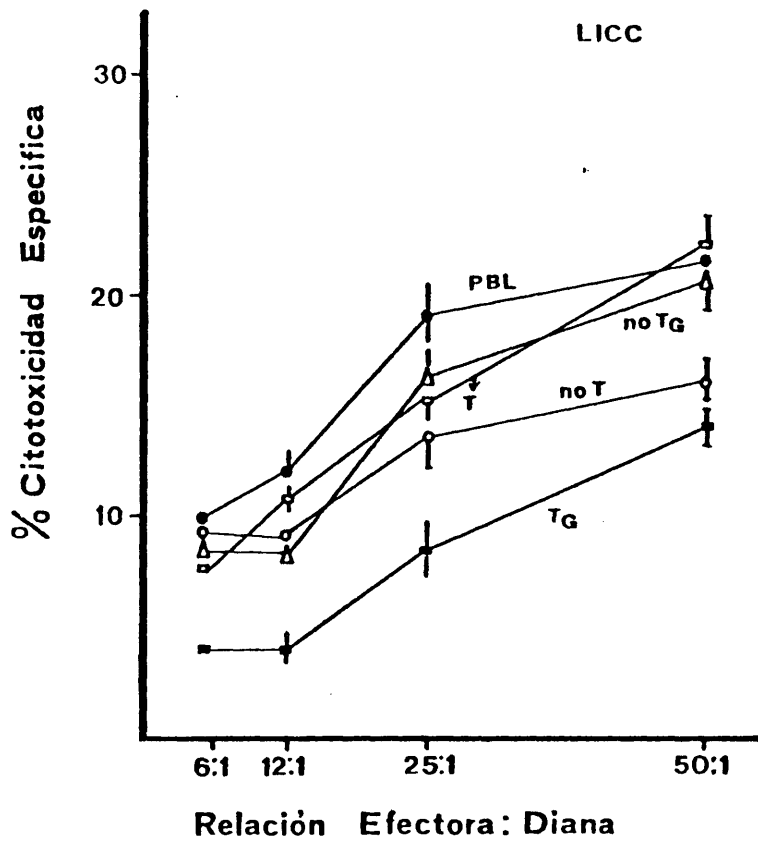


Figura 8

TABLA 9

MARCADORES DE SUPERFICIE DE CELULAS EN DISTINTOS ORGANOS LINFOIDES

ORGANO LINFOIDE	% E-SRBC	% Fc(7S)	% Igs sup.	% LATEX
SANGRE	61-75	26-31	10-18	NR
AMIGDALA	32-45	0-1	37-46	1-3
BAZO	34-39	24-32	14-21	NR
TIMO	90-95	0	0-1	0-1

Los números representan valores extremos encontrados en diferentes experimentos

La amígdala que como vemos en la Tabla 10 carece de células con receptores Fc(7S), también tiene una ausencia total de la actividad citotóxica NK, incluso usando relaciones altas de células efectoras: células diana (200:1). Esta ausencia de actividad citotóxica aparece también al estudiar la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) que como sabemos necesita células con el receptor para el Fc de la IgG: células K (Tabla 10). Sin embargo, la falta de actividad NK y ADCC en la amígdala no era debida a un artefacto dado que los mismos experimentos eran capaces de ejercer actividad citotóxica mediada por lectinas (LICC) (Tabla 10).

El timo, no posee células con receptores Fc(7S) (Tabla 9) y carece de todo tipo de actividad citotóxica en ninguno de los sistemas citotóxicos estudiados: NK, ADCC y LICC (Tabla 11).

El bazo, posee un alto porcentaje de células con receptores Fc(7S) y de linfocitos T (Tabla 9). Al estudiar la capacidad citotóxica del bazo, vimos que tenía un comportamiento muy similar al de leucocitos de sangre total, con fuerte actividad citotóxica en los sistemas estudiados (Tabla 12).

Todos estos estudios sobre diferentes órganos linfoides nos ayudan a corroborar que realmente la célula efectora NK es una célula con receptores Fc(7S), ya que órganos linfoides con

TABLA 10

ACTIVIDAD CITOTOXICA EN AMIGDALA

Exp.	Relación		NK		ADCC		LICC	
	E : D		AMIGDALA	SANGRE	AMIGDALA	SANGRE	AMIGDALA	SANGRE
1	100	1.1		28.3	1.0	-	51.4	-
	50	-0.8		21.5	-2.1	25.6	30.8	41.3
2	100	0.4		30.1	1.1	-	38.1	20.5
	25	-1.2		22.8	-1.4	40.1	9.5	12.9
3	100	-0.4		18.4	-0.5	35.7	33.2	27.4
4	100	1.1		16.7	0.8	18.2	-	-

** Células de amígdala o sangre fueron ensayadas frente a K562*, Chang
 recubierta de anticuerpo** o Chang sólo, marcadas con ⁵¹Cr. En la
 actividad LICC***, se añadió al ensayo citotóxico PHA, usando una di-
 lución 1/10 en el Exp 1 y 1/100 en los Exp. 2 y 3.

TABLA 11

ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL TIMO

Exp.	LICC *		ADCC **		NK ***	
	TIMO	SANGRE	TIMO	SANGRE	TIMO	SANGRE
1	-0.8	15.7	0.7	22.4	2.1	32.4
2	0.5	27.6	-1.7	42.3	-0.7	31.8
3	-1.2	34.5	-0.6	32.4	1.1	23.7
4	0.4	18.7	-0.5	42.4	-1.0	22.5
5	1.1	19.6	0.8	53.6		

* ***) Células de sangre o timo fueron ensayadas frente a P815 ó K562 marcadas con ^{51}Cr .

a una relación de células efectora:diana de 100:1 en los experimentos 1 y 2, y de 50:1 en los experimentos restantes. LICC*, con PHA a 1/100. Los números representan la citotóxicidad específica.

TABLA 12
ACTIVIDAD CITOTOXICA DEL BAZO

	LICC		ADCC		NK	
	BAZO	SANGRE	BAZO	SANGRE	BAZO	SANGRE
1	20.4	15.3	15.7	33.2	14.5	17.5
2	30.6	15.9	29.1	33.8	37.6	28.4
3	19.1	8.2	26.7	30.1	20.7	16.4

* En los diferentes sistemas citotóxicos, células del bazo y sangre fueron ensayadas con sus células diana apropiadas a una relación de E:D de 50:1.
Para NK, K562; para ADCC y LICC Chang con anticuerpos o PHA al 1/100.

muy bajo o nulo porcentaje de células con dichos marcadores, no poseen esta actividad citotóxica espontánea, mientras que órganos linfoides con un alto porcentaje en células Fc(7S), sí que poseen dicha actividad.

III.1.3. Demostración de que la integridad del receptor Fc(7S) de la célula efectora NK, no es necesario para llevar a cabo su función citotóxica.

Tras demostrar que la célula efectora en NK es una célula con receptores Fc(7S), quisimos comprobar si este receptor juega algún papel en el mecanismo lítico de la citotoxicidad espontánea.

Para ello, nos basamos en los experimentos de Cordier(212) que demostraron que cuando el receptor Fc(7S) reacciona, bajo ciertas condiciones, con su ligando (en este caso el fragmento Fc de la IgG), se produce una modulación de este receptor que conlleva a una suelta y pérdida del mismo (Fig. 9). Linfocitos con el receptor Fc(7S) modulado, ya no son capaces de interactuar con el ligando (no forman rosetas con hematíes sensibilizados con el anticuerpo IgG), ni de ejercer funciones en las cuales la integridad de este receptor es crítica. La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), es la más conocida de

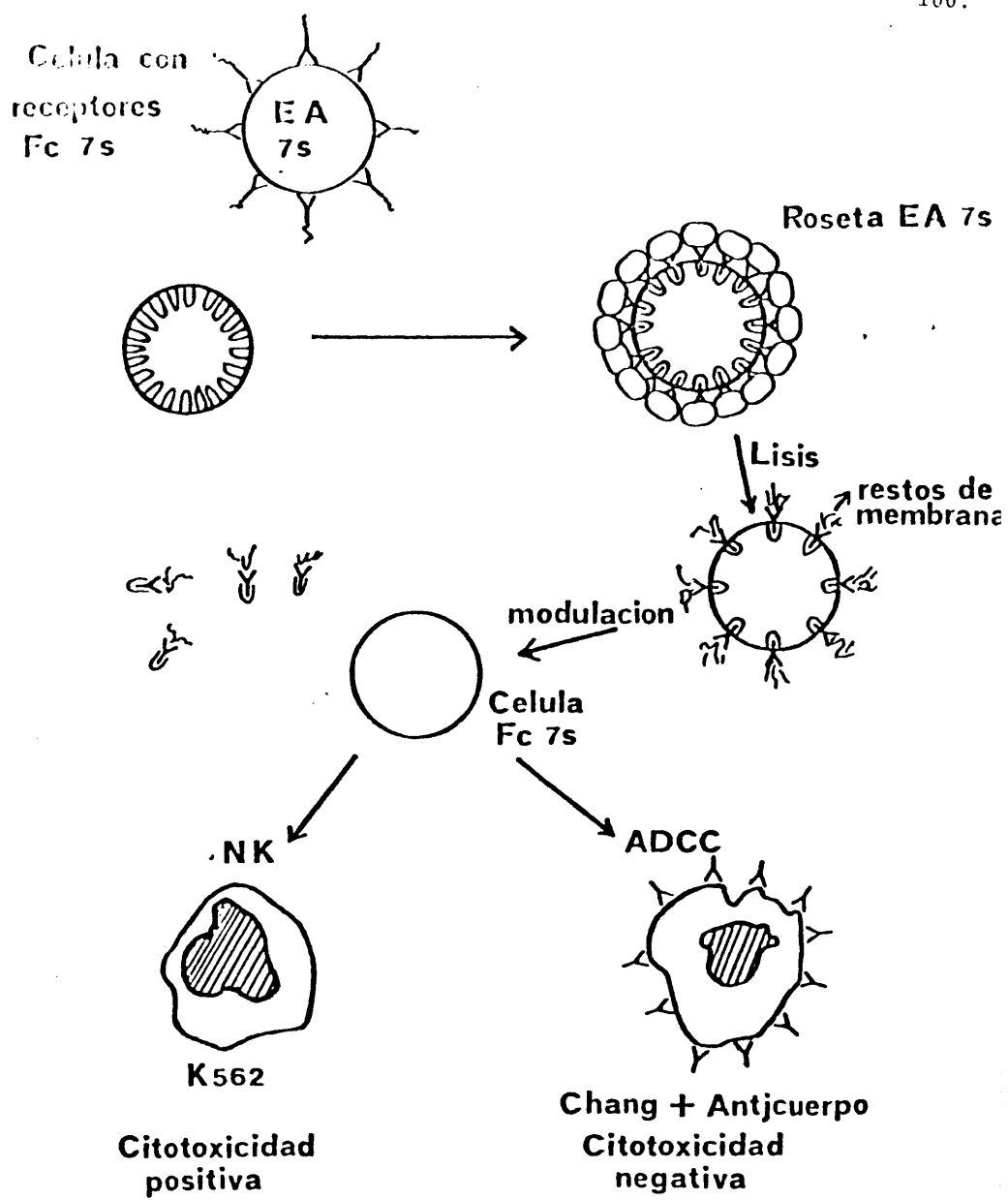


Figura 9

las funciones linfocitarias que requieren el receptor Fc(7S) intacto, dado que la lisis de la célula diana se realiza a través de la unión del fragmento Fc del anticuerpo que recubre a la célula diana y que se une al linfocito mediante el receptor Fc.

Para realizar estos experimentos, aislamos células T_G en condiciones en que se produce la modulación de su receptor Fc(7S) (incubación a 37°C) y ensayamos su actividad en citotoxicidad NK y ADCC.

En la Fig. 10 puede observarse cómo la marcada actividad de las células T se pierde cuando se aíslan las dos fracciones T_G y no T_G . Ellos es debido a que en el proceso de aislamiento, las T_G han modulado su receptor Fc(7S) y han perdido la capacidad de ejercer ADCC.

En la Tabla 13, puede observarse cómo células T_G con el receptor modulado y por tanto sin actividad ADCC, tienen por el contrario plena capacidad de mediar NK.

Estos experimentos nos indican claramente que la integridad del receptor Fc(7S) no es necesaria en el mecanismo lítico de la actividad citotóxica espontánea.

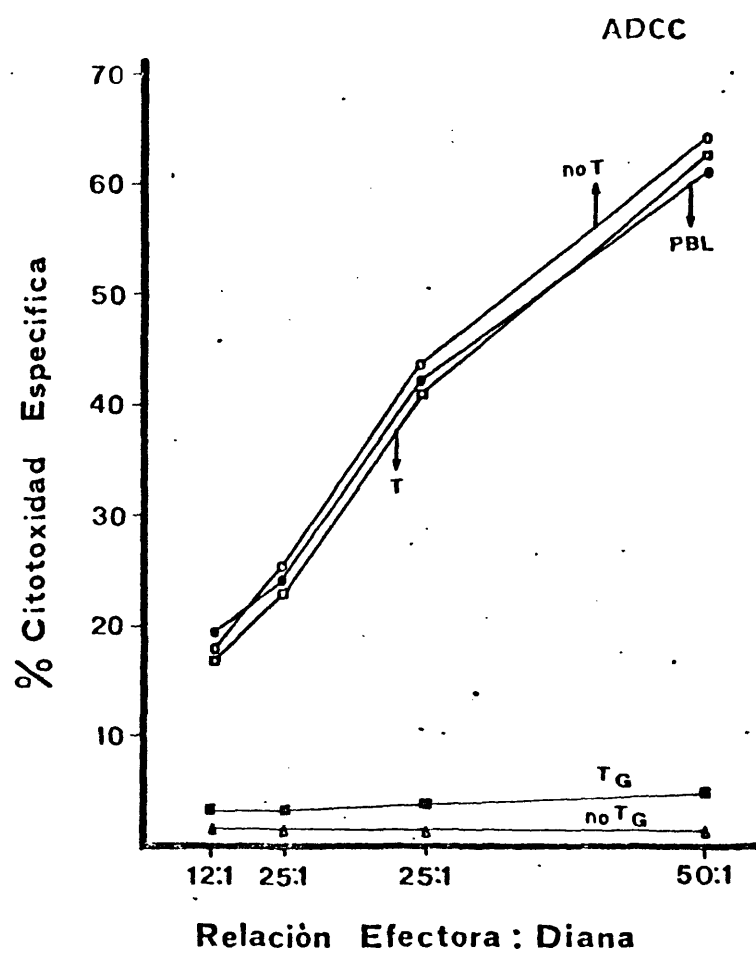


Figura 10

TABLA 13

DEMOSTRACION DE QUE LAS CELULAS T_G POSEEN UNA NORMAL ACTIVIDAD NK FRENTE A LA AUSENCIA TOTAL DE ACTIVIDAD ADCC.

Exp. N°	Células*	Unidades líticas x 10^7 cel.	
		ADCC	NK
1	Totales	80	60
	T_G	18	175
2	Totales	53	46
	T_G	14	171
3	Totales	37	43
	T_G	0	338
4	Totales	163	51
	T_G	12	136

* Leucocitos totales o células T_G , fueron usadas como efectoras en citotóxicidad NK y ADCC frente a K562 y Chang recubierta de anticuerpo como diana, respectivamente.

III.1.4. Linfocitos grandes y granulares como células efectoras en citotoxicidad espontánea.

Las células efectoras en citotoxicidad espontánea (NK), han sido recientemente descritas como un linfocito grande granular (LGL: large granular lymphocyte) (162). La evidencia para ello ha sido la siguiente: a) la mayoría de las células que forman conjugados tienen esta morfología y b) separación de linfocitos por gradientes de densidad hace que las fracciones enriquecidas en LGL sean aquellas en las que también la actividad citotóxica NK, se encuentra muy activada.

Para ello usamos por un lado células LGL purificadas en un gradiente discontinuo de Percoll tal como ha sido recientemente descrito por Timonen (207) en que las células LGL contenidas entre los leucocitos de sangre periférica se sitúa entre las zonas de Percoll de baja densidad.

Por otro lado, hemos usado una variedad de células diana no adherentes como la célula MOLT-4 y K562 o adherentes como las líneas celulares G-11, ALAB y T-24.

Tras realizar como se describe detalladamente en Material y Métodos la separación de los linfocitos en un gradiente discontinuo de Percoll, en base a su diferente densidad, las células

lulas de cada fracción se recogen, estudiando sobre ellas:

a) su morfología, sobre una tinción de Giemsa, para evaluar el número de linfocitos grandes granulares (LGL) y b) el porcentaje de células que forman conjugados con las distintas células diana (esquema Fig. 11).

Como se ve en la tabla 14, la recuperación celular en las fracciones de baja densidad es muy baja, sin embargo es en estas fracciones donde el número de conjugados es más alto, principalmente frente a las líneas K562 y MOLT-4. También es en estas fracciones donde el número de LGL y la actividad citotóxica NK es más alta (Tabla 15). Según aumenta la densidad de las distintas fracciones, hay una progresiva disminución del número de LGL así como de la capacidad de formar conjugados mientras que la actividad citotóxica NK desaparece frente a todas las células diana ensayadas. Esto puede considerarse sorprendente si tenemos en cuenta que fracciones sin actividad citotóxica todavía mantienen la capacidad de formar un cierto número de conjugados. Estos resultados también comprobados por Timonen y col. (160) con la línea K562, nos hacen pensar que hay un cierto número de linfocitos que careciendo de la capacidad citotóxica NK son capaces de formar conjugados con K562 (162).

Al tratar de evaluar el número de conjugados frente a líneas tumorales adherentes (G-11, ALAB y T-24), vimos que estas células por sí solas forman gran cantidad de agregados ce-

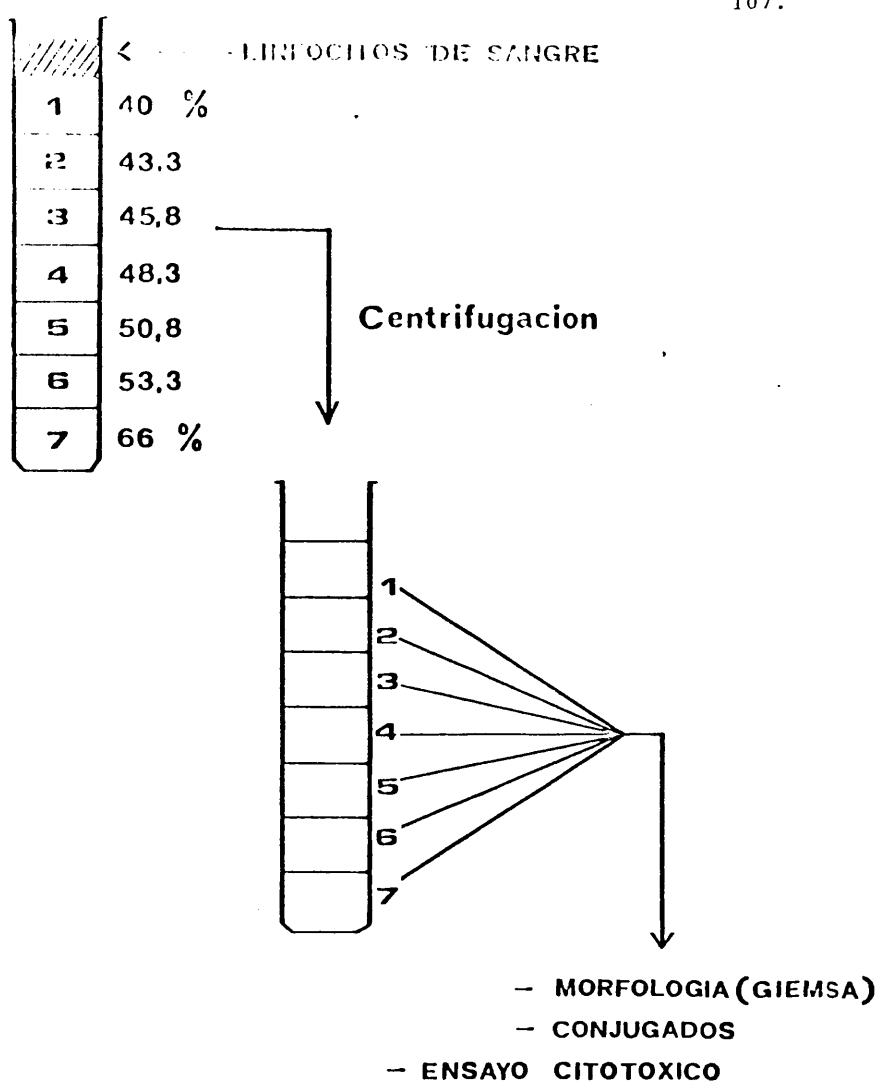


Figura 11

TABLA 14

DISTRIBUCION DE CELULAS LGL Y CONJUGADOS DE LAS DISTINTAS FRACCIONES DE UN

GRADIENTE DISCONTINUO DE PERCOLL *

Fraccion	% de células recuperadas	% LGL	% de conjugados con:		
			K562	MOLT-4	G-11
Total	-	13.8(10-16)	9.1(4-14)	5.7(3-8)	6.8(2-12)
1	0.5(0.2-0.8)				
2	1 (0.8-2.1)				
3	7.2(3.8-11.2)	42.5(28-53)	23.1(13-30)	15.0(8-20)	11.5(2-24)
4	34.6(16.4-47.3)	25.0(16-32)	13.2(9-15)	9.5(8-11)	10.4(7-17)
5	37.4(17.8-54.9)	7.8(5-10)	8.1(5-9)	3.0(1-6)	4.8(1-13)
6	15.4(8.0-20.0)	5.0(2-8)	5.2(1-9)	1.5(1-3)	3.4(1-12)
7	3.9(1.6-6.2)				

* En 9 experimentos diferentes, células, no adherentes de sangre, fueron fraccionadas en siete diferentes fracciones de un gradiente discontinuo de Percoll. Los números representan la media (rango) de los 9 experimentos.

TABLA 15

ACTIVIDAD CITOTOXICA NK DE LAS DISTINTAS FRACCIONES DE UN GRADIENTE
DISCONTINUO DE PERCOLL EN UN ENSAYO CITOTOXICO DE 4 HORAS

FRACCION *	UNIDADES LITICAS X 10 ⁷				
	K562	MOLT-4	G-11	ALAB	T-24
CELULAS TOTALES	22.0(4-87)	13.6(<1-40)	<1	<1	<1
3	154.7(18-400)	85.0(40-130)	17.0(<1-60)	5.8(<1-27)	1.0(<1-6)
4	44.7(11-120)	23.0(17-30)	3.2(<1-13)	<1	NR
5	1.6(<1-8)	<1	<1	<1	<1
6	<1	<1	<1	<1	<1
7	<1	<1	<1	<1	<1

* Leucocitos totales no adherentes(Células totales), fueron fraccionados en diferentes fracciones en un gradiente discontinuo de Percoll y cada una de ellas ensayadas en citotoxicidad NK contra las diferentes células diana mar-
cadas con ⁵¹Cr, en un ensayo de 4 horas.

lulares, lo que dificultaba grandemente la posible y correcta evaluación del número de conjugados. Estas células, quizá por el hecho de que haya que soltarlas del plástico con tratamientos de tripsina, o quizás por sus propias características en membrana, son muy adherentes, principalmente las líneas tumorales ALAB y T-24; y ésta es la razón de no poder incluir en la Tabla 14 el número de conjugados de las distintas fracciones de Percoll usando estas células como diana. El mismo problema, aunque en menor grado, le ocurría a la línea G-11 y así como puede verse en la Tabla 14, vimos una amplia variación en el número de conjugados de los diferentes experimentos realizados.

Con respecto a la actividad citotóxica NK, habíamos visto como las fracciones con células con un alto porcentaje en LGL, presentaban también una alta actividad citotóxica frente a todas las células diana ensayadas con nula actividad citotóxica en fracciones de Percoll de alta densidad y bajo porcentaje de LGL (Tabla 14 y 15). Como en las fracciones de alta densidad el porcentaje de conjugados aunque bajo no es despreciable, aunque sí su actividad citotóxica, quisimos comprobar si con mayores tiempos de incubación del ensayo citotóxico podríamos detectar una actividad citotóxica en dichas fracciones. Experimentos realizados con 18 horas de incubación frente a todas las células diana marcadas con ^{51}Cr , nos indican que aunque los niveles de citotoxicidad son mayores con respecto a los

observados en ensayos cortos de 4 horas, seguimos sin detectar ninguna actividad citotóxica en aquellas fracciones de alta densidad y bajo porcentaje de LGL (Tabla 16). Estos experimentos no pudieron realizarse usando la línea tumoral MOLT-4, debido a la alta suelta espontánea en el ensayo de 18 horas.

De todos estos experimentos podemos concluir: a) que la célula que principalmente forma conjugados con todas las líneas tumorales estudiadas tiene morfología de LGL ya que sistemas que enriquecen en estas células también enriquecen el porcentaje de células formando conjugados y b) la célula LGL también es la célula efectora citotóxica ya que los mismos sistemas de enriquecimiento en LGL aumentan grandemente en su actividad lítica frente a células diana. Es decir, la célula efectora en citotoxicidad espontánea es en su mayoría un linfocito grande y granular.

Por último, cabía la posibilidad de que la alta actividad en las fracciones de baja densidad y muy ricas en LGL fuese debido a que de alguna manera hubiéramos eliminado una población que interfiriese negativamente sobre la actividad citotóxica NK. Para probar esta posibilidad, las células de las fracciones de baja densidad fueron mezcladas con células de las fracciones de alta densidad y de esa manera ensayadas en su actividad NK. En dos experimentos representativos de la

TABLA 16
ACTIVIDAD CITOTOXICA NK DE LAS DIFERENTES FRACCIONES DE UN GRADIENTE
DISCONTINUO DE PERCOLL EN UN ENSAYO CITOTOXICO DE 18 HORAS

Fracción *	UNIDADES LITICAS X 10 ⁷			
	K562	G-11	ALAB	T-24
Celulas Totales	31.3(3-35)	30.3(1-32)	4.0(<1-16)	1
3	207.6(150-307)	103.7(36-139)	21.7(4-39)	7.2(2-12)
4	126.0(29-313)	10.3(1-28)	NR	NR
5	10.2(<1-41)	<1	NR	NR
6	<1	<1	<1	<1
7	<1	<1	<1	<1

* Leucocitos totales no adherentes(Células totales), fueron fraccionados en un gradiente discontinuo de Percoll y cada una de ellas ensayadas en citotóxicidad NK contra las diferentes células diana marcadas con ⁵¹Cr, en un ensayo de 18 horas de duración.

Tabla 17, se observó que no existe ningún tipo de inhibición de la actividad citotóxica en las fracciones de baja densidad tras mezclarlas con células de las fracciones de alta densidad, lo que elimina cualquier efecto supresor de estas células sobre la actividad NK.

III.2. DEMOSTRACION DE QUE LAS CELULAS EFECTORAS EN NK PERTENECEN A LA MISMA POBLACION QUE LAS CELULAS EFECTORAS EN ADCC.

Las células efectoras que median la actividad citotóxica NK y ADCC tienen gran cantidad de características comunes (132) ya que ambas tienen: a) receptores Fc(7S), con baja afinidad para los hematíes de carnero (células "null" y T_G) y b) una misma distribución a través de los distintos órganos linfoides: órganos como el bazo o la sangre periférica presentan actividades citotóxicas NK y ADCC mientras que ambas actividades están ausentes en timo y amígdalas.

La similitud entre las células efectoras de ambos sistemas nos llevó a investigar si la población efectora en NK y ADCC podría ser la misma, aunque llevando a cabo la citotoxi-

TABLA 17

ACTIVIDAD NK TRAS LA MEZCLA DE DIFERENTES FRACCIONES DE UN PERCOLL

		% DE ACTIVIDAD ESPECIFICA							
		K562		G-11		ALAB		T-24	
Células*		1	2	1	2	1	2	1	2
3	39	28.2	26.4	13.6	9.9	14.1	7.8	8.2	
3+6	37.4	26.3	24.2	15.2	7.2	12.3	7.0	7.5	
6	3.0	1	1.9	2.1	0.1	2.1	-1.2	-1.1	

* Las células efectoras fueron las siguientes: Células de la fracción 3 (75×10^3) sólo o mezcladas con células de la fracción 6 (75×10^3) y células de la fracción 6 (150×10^3). Las células efectoras y 5×10^3 células diana, marcadas con ^{51}Cr , fueron incubadas por 18 horas.

cidad mediante mecanismos diferentes. La célula K, efectora en ADCC, mata a través de interacciones de su receptor Fc(7S) y la porción Fc de la inmunoglobulina que recubre la célula diana. Por tanto, la citotoxicidad ADCC requiere la integridad de este receptor, mientras que la célula receptora en NK, no necesita dicho receptor para llevar a cabo su mecanismo lítico.

Con este fin, hemos empleado dos diferentes diseños experimentales: 1) en experimentos de inhibición de la citotoxicidad con células diana frías, examinamos si la competición por las células efectoras en actividad NK iba acompañada por una simultánea inhibición de la actividad ADCC, y 2) examinamos si la eliminación específica de las células NK por adsorción en monocapas de células diana sensibles a NK iba acompañado de un descenso paralelo en el número de células K y por tanto en la actividad ADCC.

III.2.1. Experimentos de inhibición usando células diana frías (no marcadas radiactivamente).

Este tipo de ensayo ha probado ser un excelente método en el estudio de la especificidad de la citotoxicidad celular (CMC) (210). Se basa en un sistema de competición en el que se observa una inhibición de la citotoxicidad cuando se añaden cé

lulas diana frías que expresan los antígenos específicos hacia los cuales la célula efectora está dirigida. Nosotros estudiamos la posibilidad de que las células tumorales sensibles a la lisis NK fueron capaces de actuar como células inhibitorias frías (no marcadas) en un ensayo ADCC.

En estos experimentos existiría competición sólo si NK y ADCC fuesen mediadas por las mismas células efectoras, mientras que la inhibición no podría ser detectada si ambas actividades fuesen llevadas a cabo por diferentes poblaciones celulares (vease Fig. 12).

En experimentos simultáneos de NK y ADCC, nosotros estudiamos células diana frías altamente susceptibles a la citotoxicidad NK como las líneas celulares K562 y E-14, que competían en ambos sistemas. Como controles usamos células diana resistentes a NK como hematíes de pollo (CRBC) o la línea de ratón P815.

En la Fig. 13 puede observarse como los buenos inhibidores de la actividad NK, K562 y E-14 que lógicamente son células diana sensibles a NK, eran también buenos competidores del sistema ADCC e inversamente, pobres inhibidores de la actividad NK; y a su vez células diana poco sensibles a NK, CRBC y P815, no competían en ADCC. Así nunca vimos competición en ADCC, con

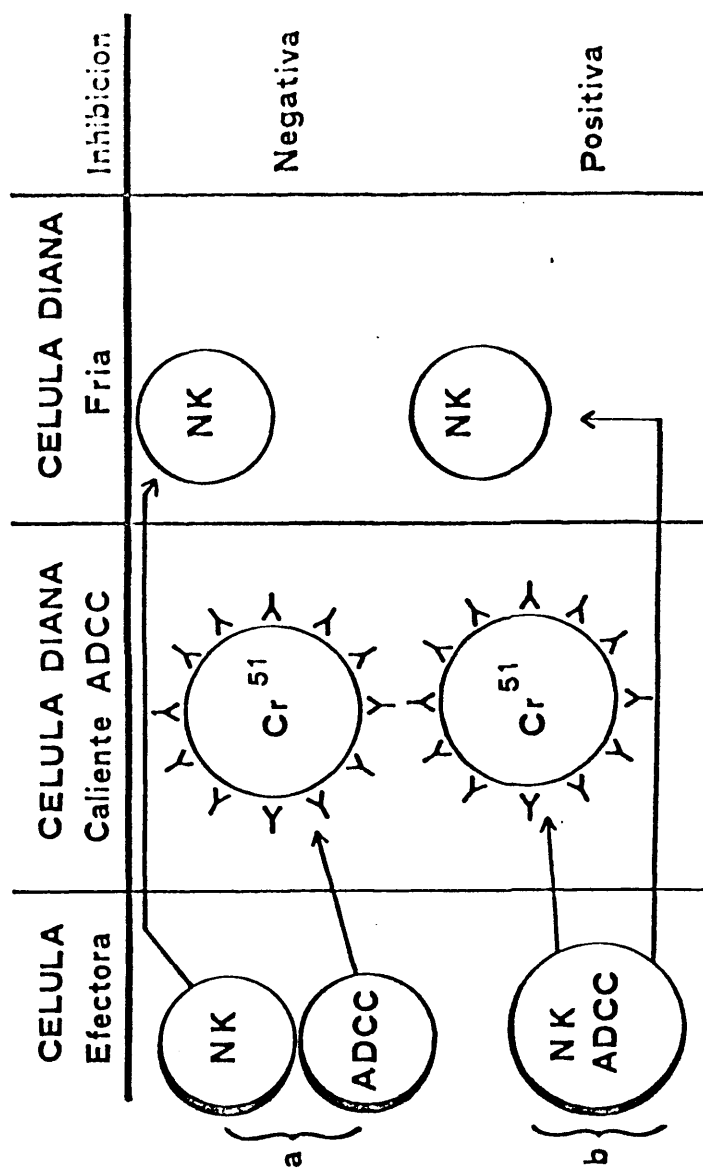


Figura 12

células diana que no eran sensibles a la actividad NK, ni ausencia de competición en ADCC por células sensibles a NK.

En este tipo de experimentos con ADCC, es importante eliminar la posibilidad de que la inhibición observada no es debida a la formación de nuevos complejos células diana frías-anticuerpos, debida a la suelta de anticuerpos de las células diana marcadas radioactivamente, que se fijan a las células frías usadas en la competición. Esto parece no ser el caso ya que incluso cuando anticuerpos heterólogos fuertemente activos contra las células humanas (antisuero conejo anti-células Chang) fueron usados en el sistema ADCC, la inhibición sólo ocurría con células diana sensibles a NK y no con otras células diana humanas, como Chang usadas como células competidoras. Sin embargo, para eliminar completamente esta posibilidad, hemos empleado en experimentos de ADCC, células diana recubiertas de anticuerpos que no tuviesen reacción cruzada con las células humanas competidoras. Por ejemplo, células P815 que es un mastocitoma de ratón, recubierto de anticuerpos específicos. De nuevo, y bajo estas condiciones, sólo células K562 y E-14 competían con éxito en sistemas ADCC (Fig. 13c).

Otra posibilidad que debe ser tomada en cuenta y eliminada, es que la inhibición observada en los sistemas ADCC, no fuese debido a la presencia de receptores Fc(7S) sobre las cé-

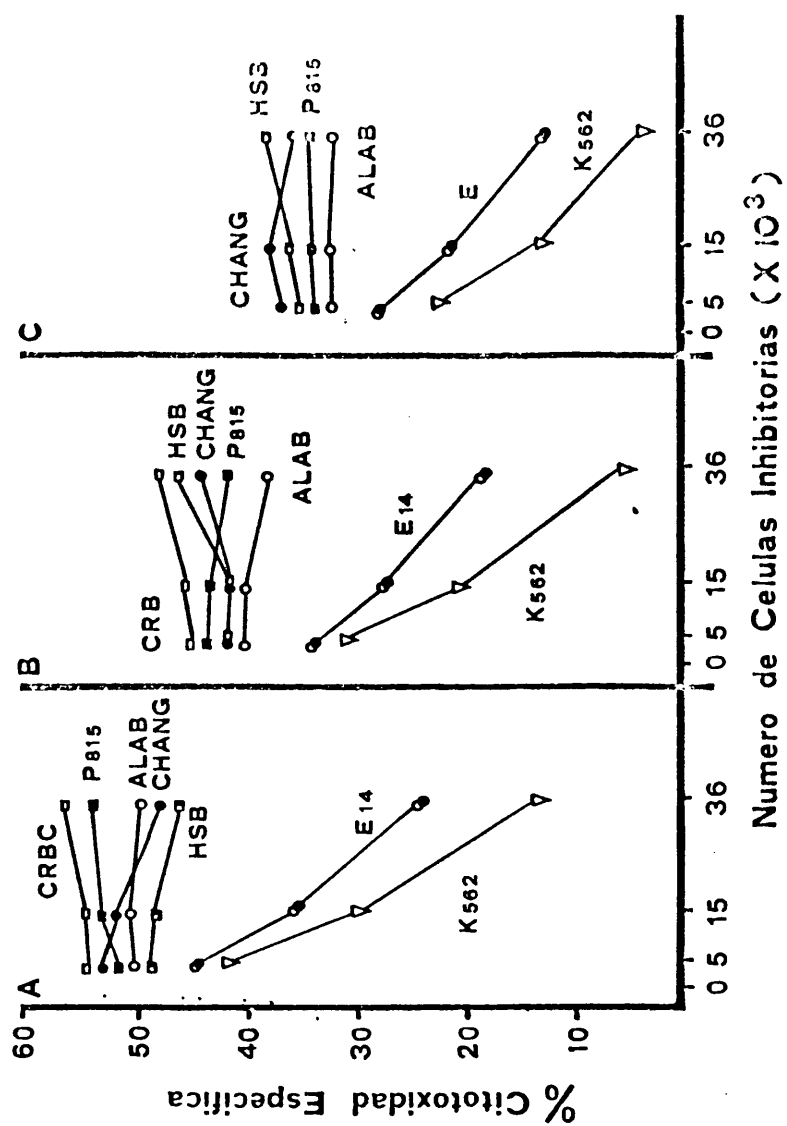


Figura 13

lulas competidoras. Células competidoras llevando receptores Fc(7S) pueden unirse a las células diana marcadas y por lo tanto protegerlas de la posible posterior unión de la célula efectora. Así nosotros examinamos la presencia de receptores Fc(7S) en las diferentes células competidoras empleadas. Mientras que el 100% de las células K562 tenían estos receptores, la línea E-14 carecía de ellos (Tabla 18). Esto nos indica que aunque la inhibición de ADCC por K562 pueda ser debido a la interacción a través del receptor Fc(7S), la inhibición por E-14 no puede ser debida a este mecanismo.

Finalmente, si las células efectoras que median ambos tipos de citotoxicidad fuese las mismas, es de esperar que células diana que compitan en ambos sistemas lo hagan induciendo similares porcentajes de inhibición. Como se ve en la Tabla 19, similares porcentajes de inhibición son obtenidos en sistemas NK y ADCC después de la adición de diferentes cantidades de E-14.

III.2.2. Experimentos de adsorción.

Si las células efectoras en NK y ADCC fuesen la misma población celular, adsorción de células NK sobre monocapas de células diana sensibles a NK resultaría en una simultánea eliminación de células K, efectoras del sistema ADCC (Fig. 14). Sin

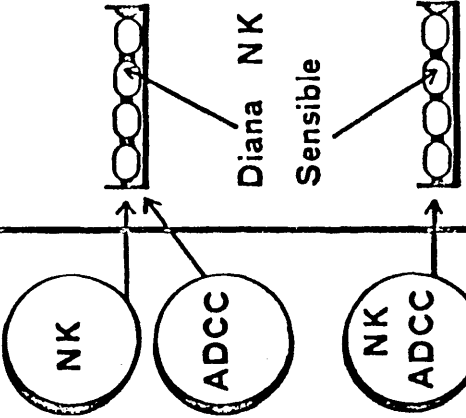
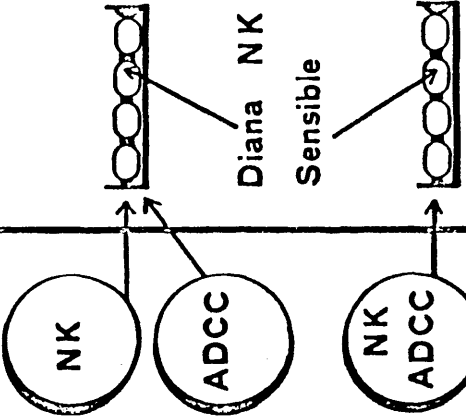
MONOCAPA		Poblacion no ADHERENTE	Citotoxicidad en:	
			NK	ADCC
		ADCC	—	+
		—	—	—

Figura 14

TABLA 18

PRESENCIA DE RECEPTORES Fc(7S) SOBRE LAS CELULAS TUMORALES
EMPLEADAS COMO CELULAS COMPETIDORAS

Células	% de células formando rosetas
K562	100
CHANG	0
E-14	0
ALAB	0
HSB	0

TABLA 19

CAPACIDAD INHIBITORIA DE LAS CELULAS E-14 EN LOS SISTEMAS
NK y ADCC

Exp.	Nº de células añadidas	% de inhibición	
		NK	ADCC
1	5	20.3	24.6
	15	25.1	24.7
	36	42.3	46.3
2	5	25.1	21.2
	15	38.8	41.4
	36	53.5	55.7
3	5	16.4	9.3
	15	25.7	20.2
	36	34.4	36.8
4	5	32.3	38.2
	15	44.4	38.2
	36	63.5	76.3

Cantidades crecientes de células (desde 5×10^3 hasta 36×10^3) competidoras frías E-14 fueron añadidas a un n° constante de células efectoras (2.5×10^3) y células diana marcadas con ^{51}Cr (5×10^3) variando la proporción de las células efectoras sobre el total de las células diana desde 25:1 hasta 6:1. La célula citotóxica del ensayo NK es la K562 y en el ADCC es la Chang con anticuerpos. El % de Inhibición se calculó como: % citotoxicidad específica en presencia de células diana frías / % citotoxicidad específica sin células competidoras) x 100

embargo, el primer problema con que nos encontramos fue la necesidad de obtener monocapas resistentes y confluyentes de células diana sensibles a NK dado que ninguna de estas células crecen adherentes al plástico o vidrio.

Para ello desarrollamos una técnica de formación de monocapas de células tumorales no adherentes unidas a un soporte sólido (209). Como puede observarse en la Fig. 15, las células diana K562 se unían a través de una lectina, como la PHA, a un soporte constituido por hematíes de pollo previamente pegados al plástico con poli-L-lisina y glutaraldehído. De esta manera, se formaban monocapas de células diana lo suficientemente estables y confluyentes para poder adsorber, sin grandes pérdidas inespecíficas, células efectoras.

Una vez resuelta la formación de monocapas, buscamos las condiciones óptimas para la eliminación de células efectoras en NK. Como puede verse en la Tabla 20, linfocitos humanos fueron adsorbidos sobre K562 o sobre monocapas controles (células de ratón P815) y la adsorción fue monitorizada por el número de células recobradas y por la actividad NK en la fracción no-adherente. Monocapas de K562, pero no de P815, son efectivas en la eliminación de la actividad NK, con mayor eficiencia cuando la placas son centrifugadas (5 min. a 900 rpm) e incubadas por cortos periodos de tiempo. En estas condiciones, la activi-

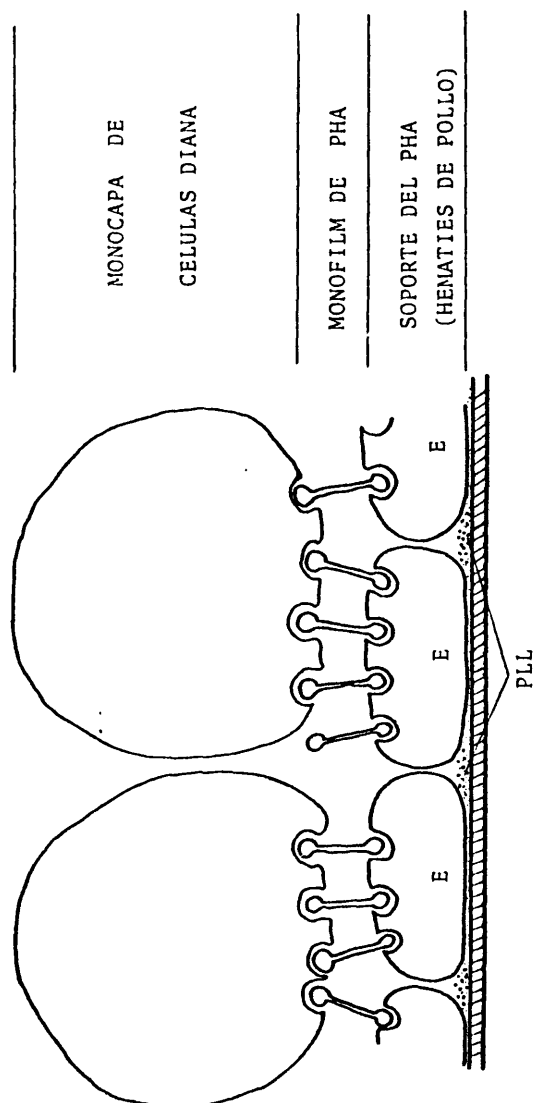


Figura 15

TABLA 20

ADSORCION DE LINFOCITOS SOBRE MONOCAPAS DE K562: RECUPERACION CELULAR Y ACTIVIDAD NK

Exp. Procedimiento de adsorción	% de recuperación celular		% de recuperación actividad NK **	
	P815	K562	P815	K562
1 Incubación (30 min.)	85	69	90	74
Incubación (60 min.)	66	49	82	66
Incubación (90 min.)	60	37	75	61
2 Centrifugación + incubación (30 min.)	96	61	95	25
Centrifugación + incubación (60 min.)	88	54	90	30
Centrifugación + incubación (90 min.)	88	50	85	32
3 Centrifugación + incubación (0 min.)	94	72	97	35
Centrifugación + incubación (10 min.)	98	74	95	28
Centrifugación + incubación (30 min.)	88	57	90	30
4 Centrifugación + incubación (0 min.)	89	78	96	35
Centrifugación + incubación (15 min.)	85	63	97	24

* Linfocitos de sangre fueron adsorbidos sobre P815 o K562, con o sin centrifugación seguido de la incubación por diferentes periodos de tiempo.

** Los números representan: (U.L. células no adherentes/U.L. controles no adsorbidos) X 100.

dad citotóxica NK de las células no-adherentes a monocapas de K562, fue muy reducida (Tabla 22), mientras que en monocapas control, la adherencia era despreciable y la recuperación de células NK casi total. Períodos más largos de incubación de los linfocitos por la monocapa no aumentaba la eliminación de células NK y algunas veces sí aumentaba la pérdida celular en monocapas control. En las poblaciones linfocitarias no-adherentes a monocapas de K562, se observó una marcada reducción en la actividad, paralela a la observada con la actividad NK mientras que en monocapas control obteníamos una total recuperación de la actividad NK y ADCC (Fig. 16 y Tabla 21).

En estos experimentos el grado de reducción en la actividad NK y ADCC era similar (Tabla 21), lo que nos volvía a indicar que se trataba de una misma subpoblación celular. Finalmente, ya que las células NK y células K llevan receptores Fc(7S), también determinamos si la eliminación de células NK era seguida por una reducción en el número de linfocitos llevando dicho receptor. Como se ve en la Tabla 21, tras la adsorción de linfocitos sobre monocapas K562, había una significativa reducción en el número de células con receptores Fc(7S).

En todos estos experimentos es importante eliminar la posibilidad de que esta reducción observada en las actividades NK y ADCC no sea debido a la contaminación de la población lin

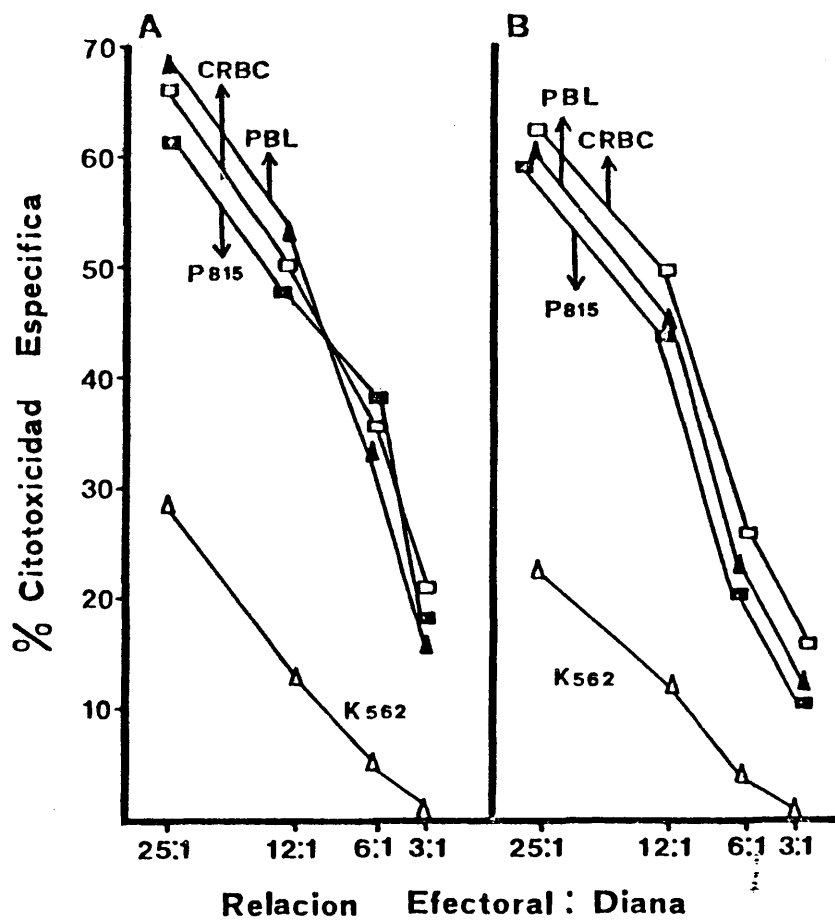


Figura 16

TABLA 21

REDUCCION SIMULTANEA DE LA ACTIVIDAD NK, ADCC Y DE CELULAS Fc(7S)⁺ TRAS LA ADSORCION DE LOS LINFOCITOS EN MONOCAPAS DE K562

Exp. Monocapa	NK		ADCC		CELULAS Fc(7S) ⁺	
	U.L.	% perdida de actividad	U.L.	% perdida de actividad	% células Fc(7S) ⁺	% de perdida
1	150		80		21	
	145	3.4	75	6.3	23	-9.5
	35	76.7	25	68.8	9	58.2
2	158	-5.3	75	6.3	22	-4.8
	162		195		25	
	162	0	197	-1.0	23	8.0
3	50	69.2	67	65.7	13	48.0
	97		82		17	
	100	-3.1	77	6.1	19	-11.8
4	42	56.8	31	62.2	10	41.2
	102	-5.2	81	1.3	18	-5.9
	115		85		16	
5	105	8.7	80	5.9	17	-6.3
	40	65.3	35	58.9	7	56.3
	115	0	86	-1.2	15	6.3

Linfocitos de sangre fueron adsorbidos sobre diferentes monocapas por centrifugacion e incubacion (10 min, 37°C).

focitaria no-adherente de células tumorales que hayan podido soltarse de la monocapa, las cuales actuarían como células diana frías y competidoras de las células marcadas, durante el ensayo citotóxico. Hay varias líneas que descartan dicha posibilidad. Primero, microscópicamente en las poblaciones no-adherentes nunca observamos células tumorales K562, las cuales son fáciles de distinguir de los linfocitos por su gran tamaño y por el aspecto de su citoplasma. Segundo, en las poblaciones no-adherentes hay siempre una reducción paralela de células con receptores Fc(7S), cosa que no ocurriría si las células K562 se soltasen de la monocapa, ya que todas las células K562 poseen dicho receptor. Además, entre el bajo número de células que rosetean con EA(7S) tras la adsorción con K562, ninguna tiene morfología de célula K562. Finalmente, marcando con timidina tritiada las células K562 usadas para formar la monocapa, se pudo observar que la contaminación de éstas en la población no-adherente era menor del 1%. Esta mínima contaminación no es suficiente para explicar el 50-70% de reducción en los experimentos de adsorción, ya que este porcentaje de reducción sólo podría ser obtenido si las células no-adherentes contuvieran entre un 10-20% de células K562 frías. (esto fue determinado mezclando células efectoras con cantidades crecientes de células diana frías y calculando el porcentaje de contaminación necesario para obtener varios niveles de reducción en la actividad NK y ADCC).

III.3. ACTIVACION DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA ESPONTANEA POR INTERFERON.

La actividad citotóxica espontánea tanto en sistemas humanos como murinos puede ser aumentada por la acción del interferon (175-179).

Sin embargo, muchas cuestiones sobre dicha acción están todavía sin resolver. Nosotros hemos investigado este efecto tanto sobre linfocitos totales como sobre diferentes subpoblaciones de los mismos de sangre humana. Con este fin, nos hemos planteado específicamente las siguientes cuestiones: 1) estudiar el efecto del IFN sobre el número de conjugados para averiguar si la activación sobre el NK se debe al reclutamiento de nuevas células efectoras y 2) investigar el efecto del IFN sobre diferentes subpoblaciones linfocitarias humanas.

III.3.1. Aumento de la actividad citotóxica NK por IFN.

Linfocitos de sangre periférica fueron incubados con 100 ó 1000 U. de IFN e incubados en diferentes proporciones con diversas células diana marcadas radioactivamente con ⁵¹Cr.

Como puede observarse en la Tabla 22, este aumento en actividad NK se observa tanto en células diana sensibles a NK (K562 y MOLT-4) como cuando usamos células no-sensibles (G-11 ALAB, T-24 y Chang). Este efecto se observa más claramente en ensayos citotóxicos de larga duración (18 horas, ya que en estas condiciones nosotros no encontramos ninguna célula diana resistente al efecto citotóxico de linfocitos tratados con IFN.

III.3.1.1. El IFN no aumenta el número de conjugados totales, aunque sí el número de conjugados citotóxicos.

Usando el sistema de formación de conjugados y el de conjugados citotóxicos en agarosa (ver Material y Métodos), estudiamos las posibles alteraciones del número de conjugados sobre linfocitos totales preincubados con IFN.

Los resultados de seis diferentes experimentos se presentan en la Tabla 23 en la que cabe destacar 1) el número de conjugados totales no variaba, manteniéndose constante tras la incubación con IFN; 2) el número de conjugados citotóxicos aumentaba significativamente en células pretratadas con IFN, desde un 21,2% a un 38,4%. Esto nos indica que el porcentaje de linfocitos citotóxicos sobre el total de linfocitos de sangre

TABLA 22

CITOTOXICIDAD ESPONTANEA DE LINFOCITOS TRATADOS O NO CON INTERFERON

LINFOCITOS*	TIEMPO	UNIDADES LITICAS X 10 ⁷					
		K562	MOLT-4	G-11	ALAB	T-24	CHANG
No tratados	4 h.	22.0(4-87)	13.6(<1-40)	<1	<1	<1	<1
Tratados INF	4 h	112.1(18-400)	19.0(<1-56)	17.2(3-60)	5.4(<1-27)	<1	20.0(16-28)
No tratados	18 h	31.3(3-35)	NR	30.3(1-32)	4.0(<1-16)	<1	NR
Tratados INF	18 h	90.3(58-116)	NR	49.7(1-99)	14.6(7-31)	14.5(<1-36)	NR

* Linfocitos totales, tratados o no con INF fueron empleados como células efectoras ensayos de 4 ó 18 horas frente a las distintas células diana marcadas con ⁵¹Cr.

Se hicieron 9 experimentos con todas las células diana, excepto con las Chang, que sólo se hicieron 3 experimentos.

humana sube desde un 2,4% hasta un 4.5%, en células tratadas con IFN y 3) mientras que en los controles el número de conjugados citotóxicos aumenta gradualmente, en linfocitos tratados con IFN había una rápida subida en el porcentaje de conjugados citotóxicos (al cabo de media hora su número era ya de un 30,1% mientras que los controles era sólo del 6.8%).

Estos datos nos dicen que no todos los linfocitos formando conjugados son citotóxicos. A los linfocitos que forman conjugados no poseen la capacidad de matar, los llamaremos "linfocitos pre-NK", para diferenciarlos de los linfocitos que poseen dicha capacidad y que llamaremos "linfocitos NK-activos": el IFN induce el paso de algunas células pre-NK a células NK-activas.

III.3.1.2. Concentración y cinética de la activación por IFN.

Usando principalmente la técnica de conjugados citotóxicos, hemos estudiado distintas concentraciones y tiempos requeridos para la activación de los linfocitos por IFN.

En la Fig. 17, se indica el tiempo mínimo requerido de incubación de la célula con IFN para lograr un aumento de la actividad citotóxica espontánea. Vemos como tras la incubación

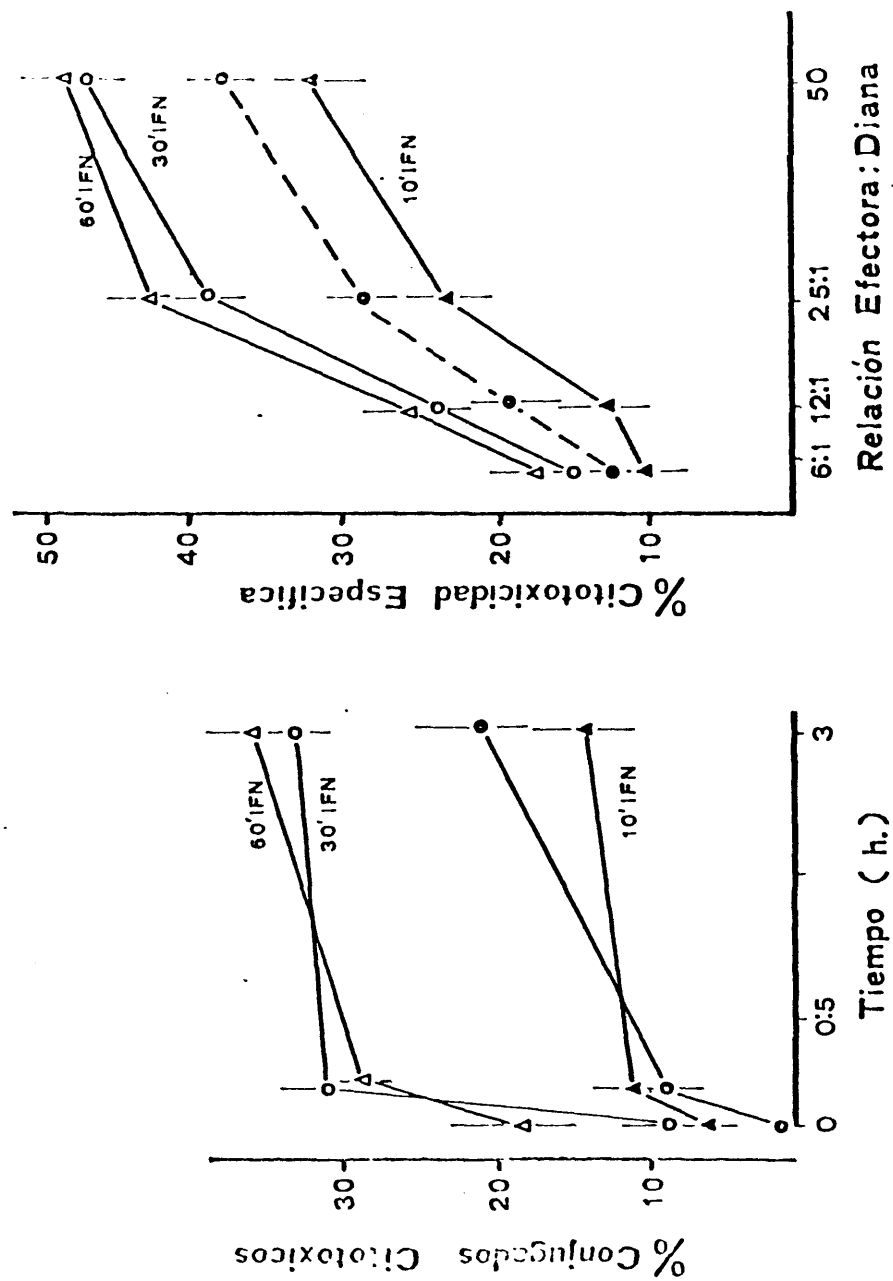


Figura 17

TABLA 23

PORCENTAJE Y CINETICA DE LISIS DE LOS CONJUGADOS CITOTOXICOS

TIEMPO	% CONJUGADOS		% CONJUGADOS CITOTOXICOS		% LINFOCITOS CITOTOXICOS TOTALES **	
	-	INF	-	INF	-	INF
0	11.6±1.2	11.8±1.4	2.5±0.8	2.0±1	0.29	0.23
1/2	-	-	6.8±1.4	30.1±4.2	0.78	3.5
1	10.8±1.6	11.0±1.2	15.4±2.2	30.8±5.1	1.78	3.6
2	-	-	18.9±3.4	33.0±3.6	2.19	3.8
3	11.1±2.0	10.6±1.9	21.2±4.0	38.4±4.0	2.45	4.5
4	-	-	22.8±4.4	-	2.64	-

* Celulas de sangre no adherentes fueron incubadas con 10U. de INF durante 30 min. y estudiados en diferentes periodos de tiempo el porcentaje de conjugados totales, y el porcentaje de conjugados citotóxicos. Los numeros representan la media de 6 experimentos. La célula diana era la K562.

** Representa el número de linfocitos NK-activos del total de leucocitos.

con 10 U. de IFN, un tiempo mínimo de 30 min. es necesario de contacto entre la célula y el IFN para que la activación tenga lugar.

Para estudiar si con tiempos más cortos de contacto de la célula con IFN logramos activación NK, incubamos las células durante sólo 5 min. con el IFN, dejándolas luego en incubación a 37°C durante diferentes períodos de tiempo (post incubación). En la Fig. 18, mostramos como tras la preincubación con 10 U. IFN durante 5 min. y una postincubación de las células durante una hora, logramos un aumento de la actividad espontánea. Este tiempo de incubación tras el tratamiento de la célula con IFN, puede ser mayor o menor según la concentración usada. Así, cuando la concentración de IFN se aumenta, tiempos de postincubación más cortos (15 min.) son suficientes para obtener un aumento de la actividad citotóxica NK. Es decir, a mayor concentración de IFN, menor tiempo de postincubación es necesario y viceversa (Fig. 19).

Por último, estudiamos si era posible la activación de la célula NK por IFN una vez que la formación de conjugados ha bía tenido lugar. Para comprobar esto, añadimos IFN a conjugados que ya habían sido formados, estudiando luego si veíamos un aumento del número de conjugados citotóxicos. La Fig. 20 claramente indica que en estas condiciones no había aumento en

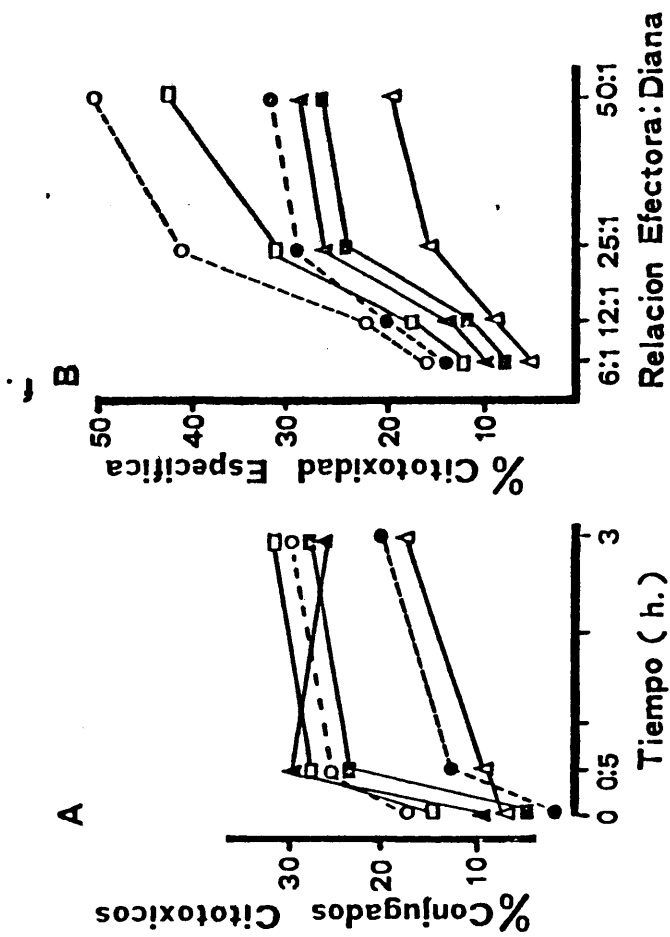
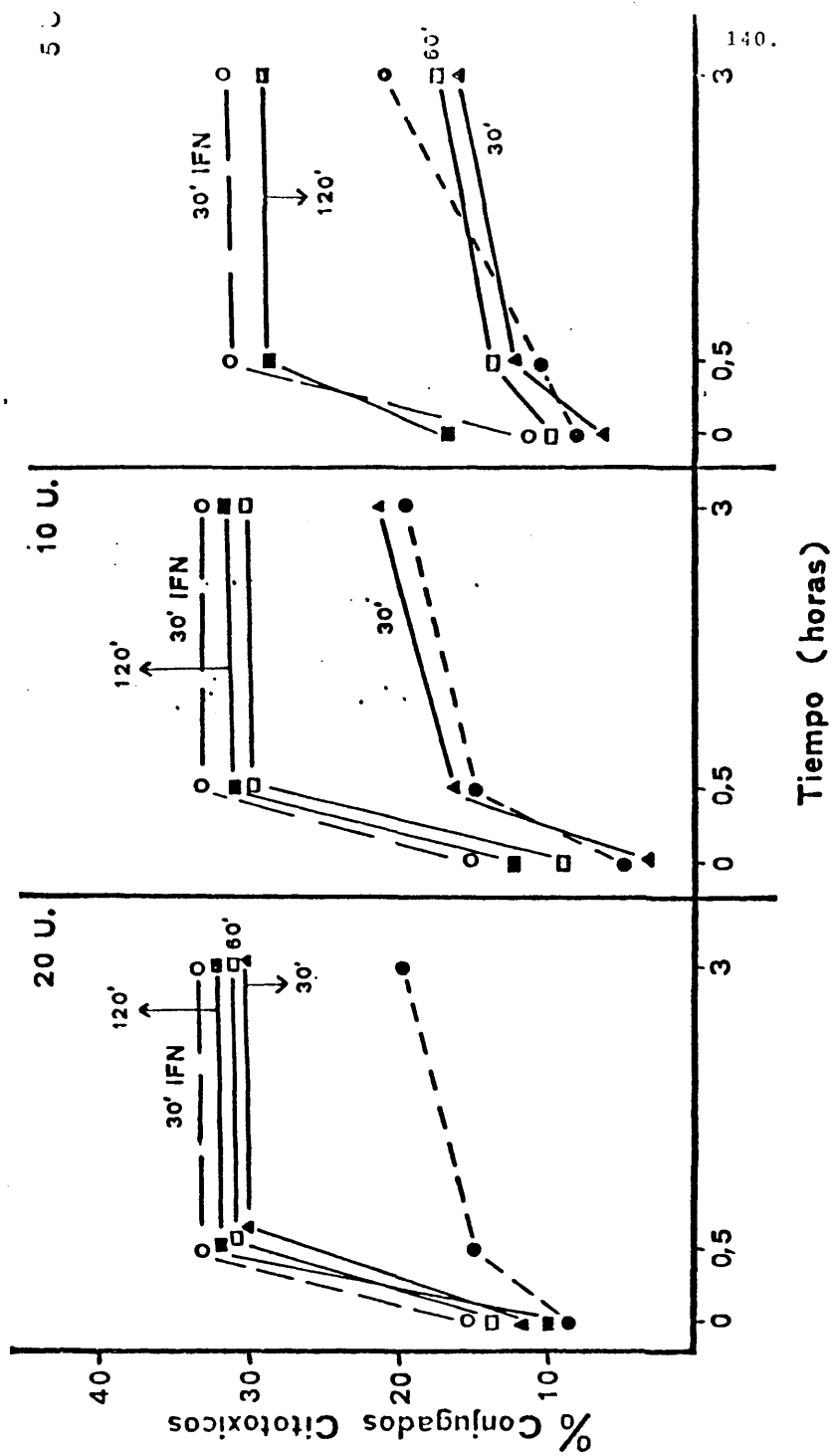


Figura 18

Figura
19



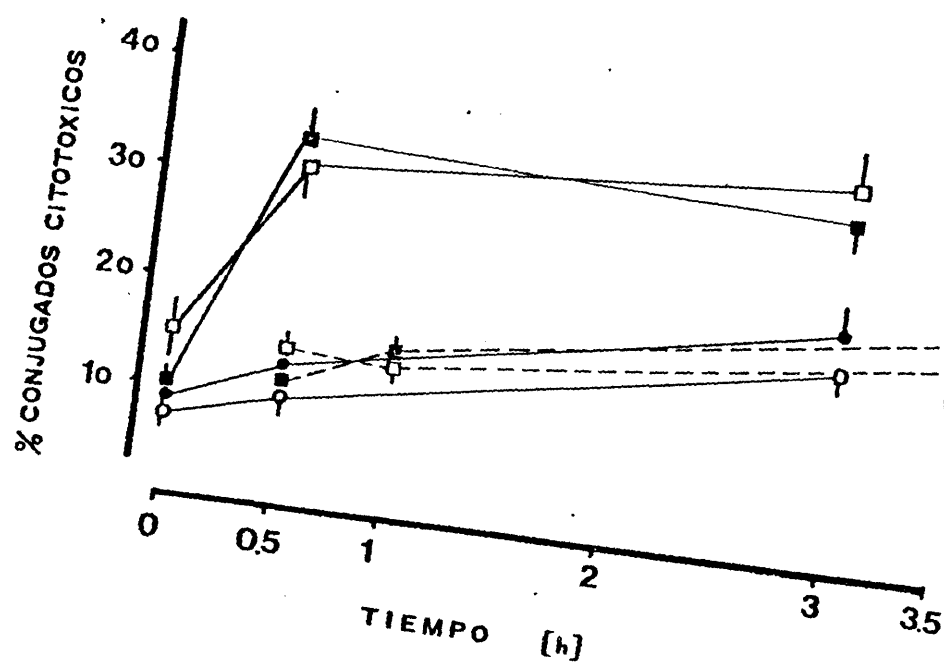


Figura 20

el porcentaje de conjugados citotóxicos, comportándose las células como controles no tratados. Esto parece indicar que la formación del conjugado puede prevenir la posterior activación del linfocito por concentraciones bajas de IFN.

III.3.1.3. Efecto reversible de la acción del IFN sobre células NK.

Para estudiar si el fenómeno de la activación por IFN era reversible, los linfocitos fueron tratados de tal modo que les inducíamos un aumento de la actividad NK por IFN, con 10 U. IFN durante 60 min., y luego lavados e incubados durante largos períodos de tiempo a 37°C en medio de cultivo.

Tras 3, 6 ó 9 horas de cultivo, las células eran retiradas del incubador y ensayadas usando la técnica de conjugados citotóxicos o por suelta de ⁵¹Cr, para comprobar en qué momento dejaban de estar activadas por IFN. En las Figs. 21 y 22, vemos como mientras que a 0 ó 3 horas hay diferencias entre las células controles y las células tratadas con IFN, éstas dejan de existir cuando la incubación se mantiene por 6 ó más horas, lo que nos dice que los linfocitos han dejado de activarse por IFN. Si estas células que tras activarse por IFN han vuelto a su línea base, fuesen de nuevo incubadas con una segunda incubación

con IFN, veríamos, como nos muestra en la Fig. 23, que de nuevo se mantiene la capacidad de aumentar la actividad citotóxica en NK y que una vez más este aumento es reversible.

III.3.2. Aumento de la actividad NK por IFN en diferentes subpoblaciones linfocitarias.

III.3.2.1. Separación de subpoblaciones en función de los marcadores de superficie.

Dado que la población efectora en citotoxicidad NK se encuentra repartida entre diferentes fracciones celulares según se separen, bien por marcadores de superficie (T_G , "null"), bien por diferentes densidades de las células (fracciones 3 y 4 de Percoll), investigamos si la activación por IFN era llevada a cabo por alguna fracción determinada o si por el contrario en todas las fracciones donde se encontraba dicha actividad citotóxica se podía detectar activación por IFN.

Para ello separamos los linfocitos de sangre periférica de acuerdo con sus marcadores de superficie en células T y no T, siguiendo la esquema de la Fig. 3, o en base a la presencia de receptores Fc(7S) en células $Fc(7S)^+$ y $Fc(7S)^-$.

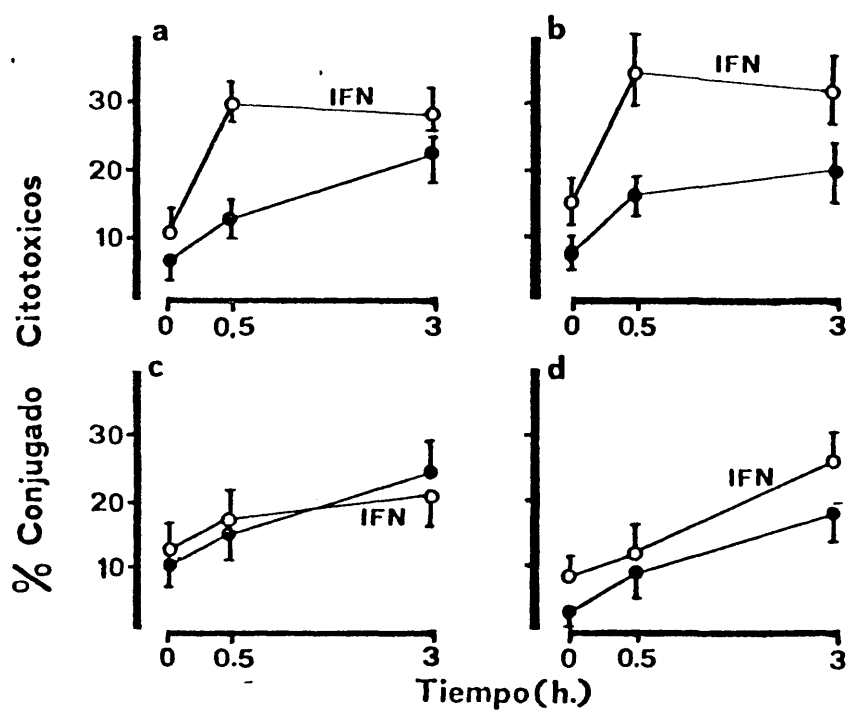


Figura 22

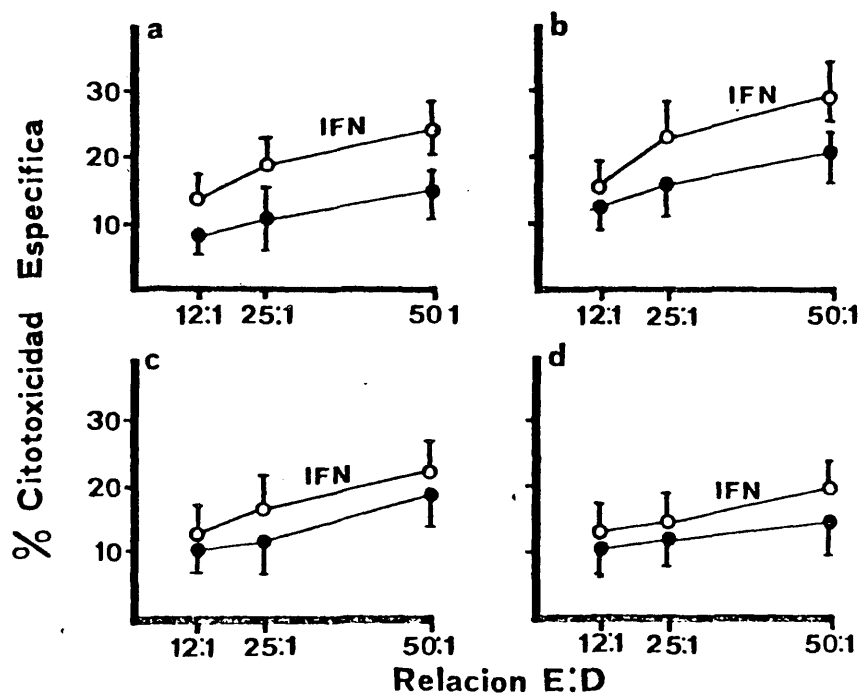


Figura 23

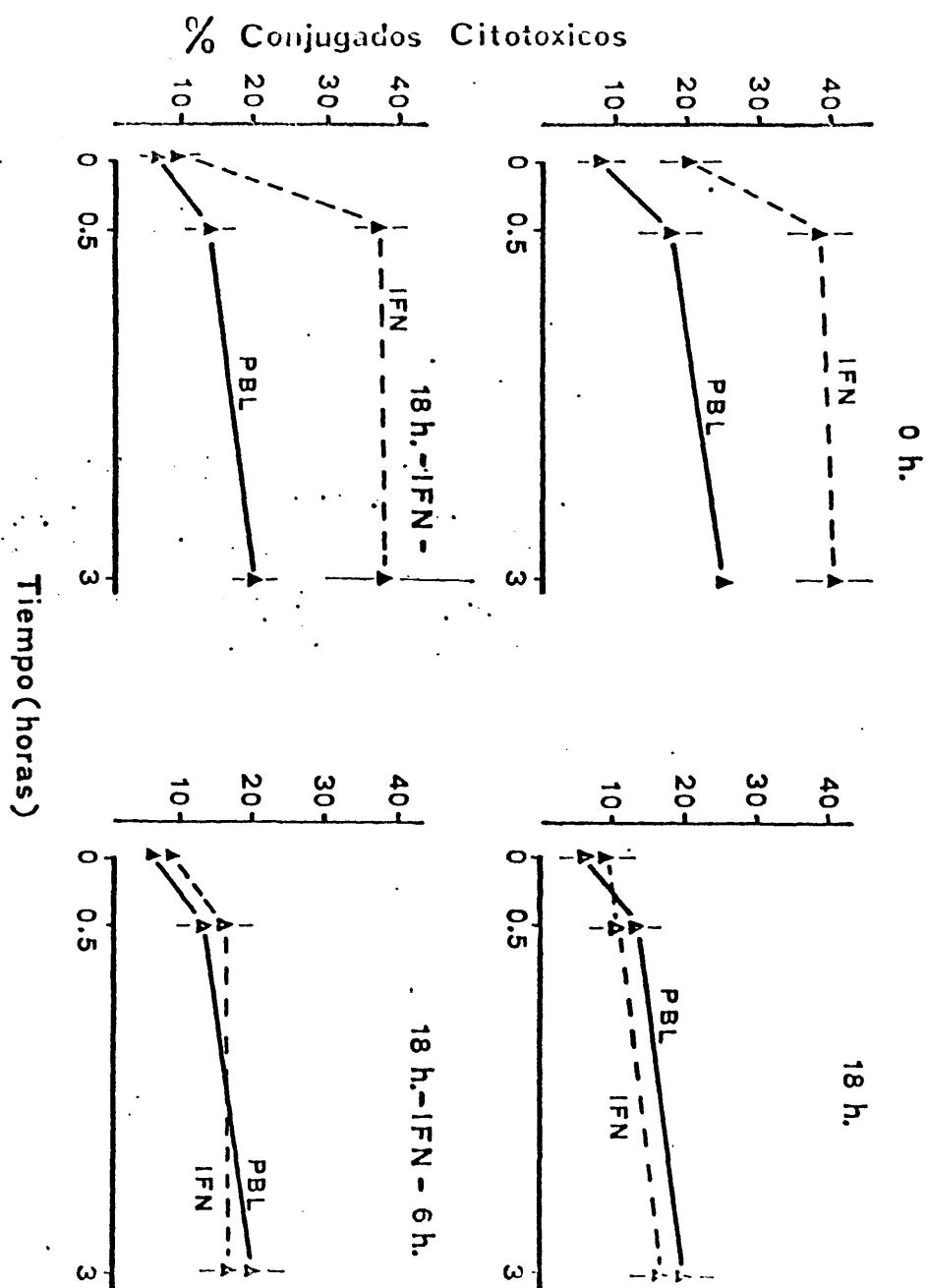


Figura 23

Cada una de las subpoblaciones así como los linfocitos totales fueron tratados o no con IFN y ensayados frente a K562 marcado con ^{51}Cr en un ensayo citotóxico de 4 horas. En la Fig. 24, puede observarse como en tres diferentes experimentos la actividad NK de las poblaciones T y no T aumenta tras su incubación por IFN. Esto nos indica que en ambas fracciones hay células que se activan por la acción del IFN.

Cuando estudiamos las fracciones $\text{Fc}(7\text{S})^+$ y $\text{Fc}(7\text{S})^-$, vemos como la fracción $\text{Fc}(7\text{S})^+$, única que tiene actividad citotóxica, es también la única que se activa por la acción del IFN (Fig. 25), mientras que la fracción $\text{Fc}(7\text{S})^-$, que carece de dicha actividad NK, no adquiere esta capacidad tras el IFN.

III.3.2.2. Separación de subpoblaciones en función del tamaño y densidad en un gradiente de Percoll.

Hemos separado también los linfocitos en base a su diferente tamaño y densidad en un gradiente discontinuo de Percoll (Fig. 11). En esta situación vemos como había un aumento en el número de células LGL, de conjugados y de actividad NK en aquellas fracciones de Percoll de baja densidad, mientras que en fracciones de mayor densidad, la actividad citotóxica NK era nula. Pues bien, tomando células de cada una de las fracciones

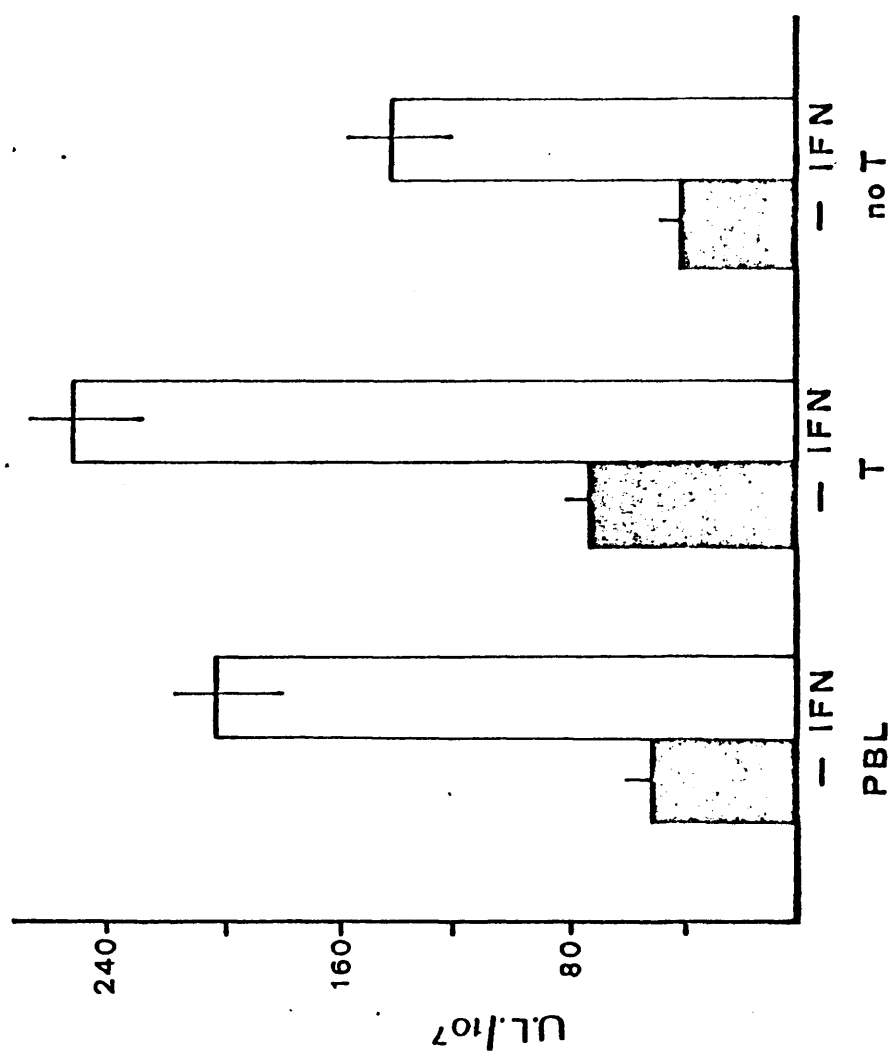


Figura 25

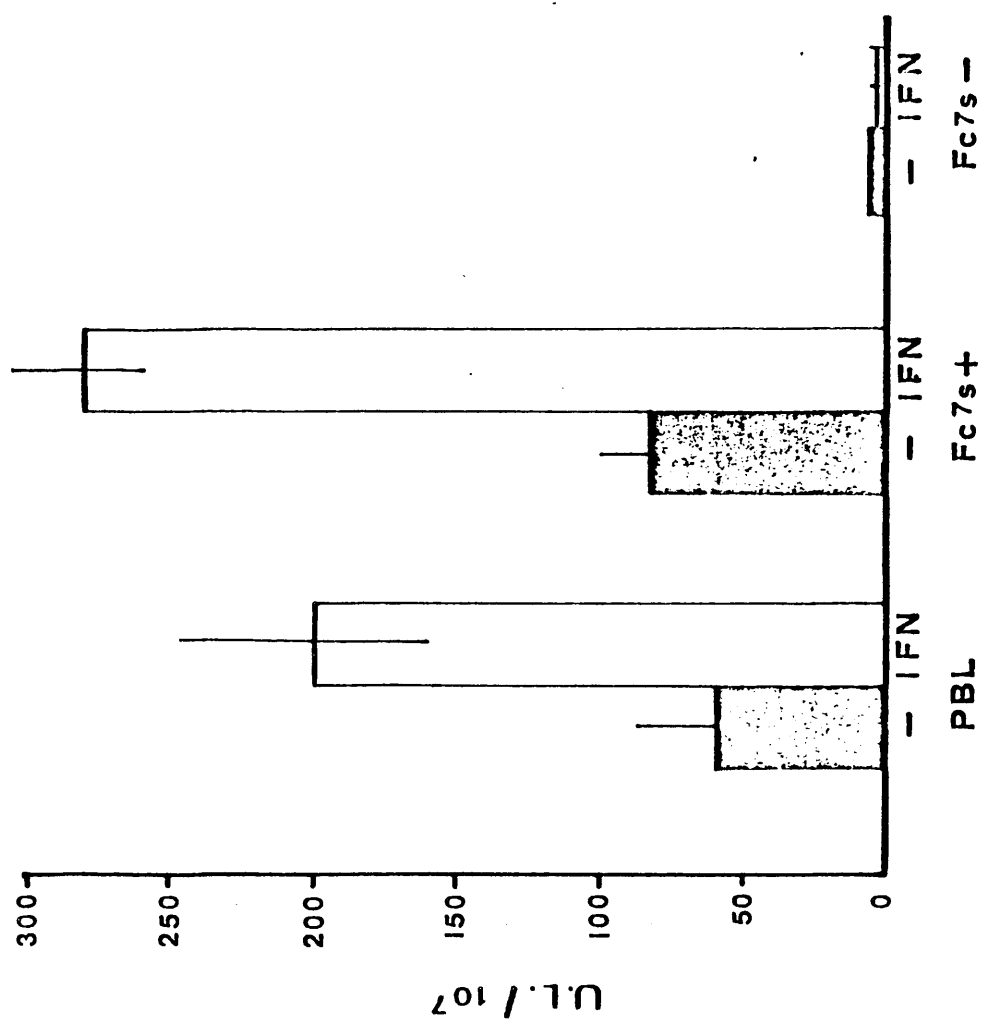


Figura 24

de Percoll, las tratamos o no con IFN y las estudiamos en un ensayo citotóxico de 4 horas frente a células marcadas K562.

Vemos en la Tabla 24 como todas aquellas fracciones que tenían actividad citotóxica NK aumentaban su actividad tras el tratamiento con IFN, mientras que aquellos linfocitos de fracciones como las 6 y 7 que carecían de actividad NK no eran capaces de adquirirla tras el tratamiento con IFN.

El conjunto de todos estos experimentos nos indica que el IFN actúa aumentando la actividad citotóxica espontánea en todas aquellas poblaciones que presentaban actividad citotóxica previa, mientras que en poblaciones que carecían de dicha actividad citotóxica, el IFN no era capaz de inducirla.

TABLA 24

CITOTOXICIDAD ESPONTANEA DE LAS DISTINTAS FRACCIONES DE UN
GRADIENTE DISCONTINUO DE PERCOLL INCUBADAS O NO CON INF

Fracción *	Unidades liticas x 10 ⁷ cel.
Total	22.0 (4-87)
Total + INF	112.1 (18-400)
3	154.7 (60-250)
3 + INF	484.8 (134-1300)
4	44.7 (11-120)
4 + INF	171.2 (106-600)
5	1.6 (<1-8)
5 + INF	23.8 (<1-66)
6	<1
6 + INF	<1
7	<1
7 + INF	<1

* Leucocitos totales o las diferentes fracciones de un
gradiente de Percoll, fueron incubadas o no con INF
y ensayadas frente a K562 en citotóxicidad NK.

DISCUSION

La razón de ser del S.I. es la defensa del organismo contra aquellas estructuras no propias que logran atravesar la barrera exterior de los organismos o que aparecen en el interior de los mismos por modificaciones de las estructuras propios. En estos mismos sistemas juegan un papel decisivo aquellas células que, por su capacidad citotóxica, pueden destruir y eliminar células extrañas malignas que aparecen dentro de los organismos. Entre estos mecanismos citotóxicos se encuentra la citotoxicidad espontánea.

En el presente trabajo, nosotros hemos estudiado los principales aspectos de la citotoxicidad espontánea en humanos. Estos incluyen: la caracterización de la célula efectora NK, tanto a través de los marcadores de superficie como morfológicamente; la relación entre estas células NK y aquellas que median la citotoxicidad ADCC, dada las grandes analogías que existen entre estos tipos de células efectoras citotóxicas; y por último, el estudio del aumento de la actividad NK tras el tratamiento con INF.

La caracterización de la célula efectora NK ha sido, como vimos en la Introducción, objeto de un intenso estudio. Uno de los problemas es la falta de un marcador específico para esta célula, así como su baja proporción en relación a otras células de sangre periférica. Nosotros calculamos que, de la fracción leucocitaria total que se separa en un gradiente de Ficoll, alrededor de un 11% de las células son capaces de formar conjugados con la línea K562, lo que representa un primer paso en el mecanismo citotóxico; pero de este 11%, solo un 20% del mismo, es capaz de lizar a su célula diana, lo que representa alrededor de un 2.5% de células NK activas del total de leucocitos. Biberfeld y col. (213), usando una técnica de placas como ensayo para detectar actividad ADCC, calcula que aproximadamente menos de un 5% de las células de sangre son células K.

Para nosotros, esta célula efectora NK está repartida entre las fracciones T_G y "null". Todas estas poblaciones, T_G , "null", así como la célula NK, presentan en humanos receptores $Fc(7S)$, ya que poblaciones enriquecidas en células $Fc(7S)^+$, poseían actividad citotóxica NK, mientras que estaba ausente en la fracción $Fc(7S)^-$. Es más, el tratamiento de estas poblaciones con INF, que es un fuerte aumentador de la actividad citotóxica NK, no lograba aumentar la respuesta NK en las fracciones desprovistas de células $Fc(7S)$,

mientras que aumentaba considerablemente, la actividad NK de la fracción $Fc(7S)^+$. La identificación del receptor $Fc(7S)$ sobre la célula NK ha sido confirmada por la mayoría de los autores, aunque para algunos, Masucci y col. (214) no todas las células NK son $Fc(7S)^+$. Por último, además, comprobamos como los linfocitos formando conjugados con K562 tenían la capacidad de hacer rosetas EA(7S), lo que afianza nuestra hipótesis.

Al comprobar si las células NK tenían receptores para los hematies de carnero, es decir, si pertenecían a la población T, vimos, que tanto la fracción T, como la no T, tenían actividad NK, en condiciones de roseteo en que, teóricamente, todas las subpoblaciones T forman rosetas. La subsecuente purificación de las células T, en T_G y T_M , nos confirmó que solamente las células T con receptores $Fc(7S)$, las T_G , poseen actividad NK. Por su parte, en la fracción no T que, comprende mayoritariamente a los linfocitos B, "null" y macrófagos, comprobamos qué fracción era capaz de llevar a cabo esta citotoxicidad NK. Todas las células de esta fracción poseen receptores para el Fc de la IgG, son $Fc(7S)^+$. La fracción responsable de la actividad NK, no podían ser los linfocitos B, ya que ninguna de las células formando conjugados tienen Igs de superficie, ni receptores para la Fc de la IgM (que ha sido demostrado por diversos autores que,

también, es propio de los linfocitos B (45,215,216).

Tampoco se podía atribuir, completamente, al macrofago toda la actividad anti K562, ya que solo un 1% de los mismos forman conjugados. Esto nos deja solamente a la población "null" como responsables de la actividad NK en esta fracción. Además para tratar de corroborar estos datos, células de la fracción no T, se pasaron a través de una fibra de nylon, que se sabe que retiene a las células adherentes como a los macrofagos, y con las células que se elufan se vió que formaban un altísimo porcentaje de conjugados con K652 (aproximadamente un 60%, datos no presentados), lo que nos quería indicar que al enriquecer en "null", también enriquecíamos en células formadoras de conjugados y por lo tanto de células efectoras NK. Todos estos experimentos apoyan la idea de las células T_G y "null" como células responsables de la actividad NK.

Uno de los problemas con que nos encontramos es con la exacta definición de las células "null", que para muchos autores no existe sino como parte de la fracción T, pero con receptores de baja afinidad para el SRBC (115,116). De hecho, West y col.(79) encuentran cómo fracciones de baja afinidad para los SRBC son las únicas que poseen receptores $Fc(7S)$, cosa que no poseen las células de alta afinidad; y es en estas fracciones donde West y col.(217) encontraban mas enriquecida la actividad ADCC. Por su parte, Kolden y col.(116), ais-

lan la fracción "null", como aquellas que quedan tras el roseteo con SRBC y pase a través de una columna IgG anti IgG (que elimina a los linfocitos B y macrófagos) y comprueba un gran aumento de la actividad NK y ADCC en estas fracciones. Para Ferrarini y col.¹¹⁴ que, estudia por distintos métodos morfológicos y citoquímicos las distintas poblaciones leucocitarias, esta población "null" que él denomina "tercera población celular" (TCP), es muy parecida, morfológicamente, a la T_G ; lo que a él le sugiere que ambos tipos de células pertenecen a un grupo especial, dentro de los linfocitos T y diferentes de los linfocitos B, T_M , y macrófagos.

Es importante por último considerar el hecho de que estas subpoblaciones se emplean, tras haber sido roseteadas y pasadas a través de un gradiente de Ficoll (205), lo que en algunas ocasiones puede ser peligroso para la estabilidad de algunas rosetas, principalmente aquellas que se basan en receptores de baja afinidad (218).

Con respecto a la morfología de las células efectoras en citotoxicidad espontánea, estudios anteriores habían demostrado como la actividad citotóxica contra la línea K562, está fuertemente asociada a linfocitos grande y granulares, LGL (160 162). Nosotros hemos comprobado este punto, extendiendo, además, estas observaciones a otras células diana, con diferen

tes niveles de sensibilidad NK. Vimos, como también usando MOLT-4, ALAB, G-11 y T-24, como células diana, la célula formando los conjugados tiene morfología de LGL y como fracciones enriquecidas en estas células tienen una fuerte actividad citotóxica NK, que, además puede aumentarse por la acción del INF. Las fracciones de alta densidad de Percoll, donde hay un bajo porcentaje de células LGL (vease Resultados 1.4) carecían de actividad citotóxica NK y esto no era debido a la presencia de células supresoras de esta actividad NK, ya que, mezclando fracciones muy enriquecidas el LGL y fracciones pobres en LGL, no encontrábamos ningún tipo de inhibición (Resultados 1.4) de esta actividad citotóxica. También, estas poblaciones pobres en células LGL, que no presentan actividad NK, ni incluso tras el tratamiento con INF (Resultados 3.2.2.), presentaban un bajo pero significativo porcentaje de células formando conjugados. Este fenómeno, también descrito por Saskela y col.(162), sobre células K562, nos indica como la mera formación de un conjugado no implica que las células que lo hagan tengan capacidad citotóxica.

Para corroborar los estudios de los marcadores, vimos si existía algún tipo de relación en diferentes órganos linfoides, entre la presencia de la actividad citotóxica NK, y la presencia de células con determinados marcadores de superficie..

La correlación en diferentes tejidos linfoides entre la actividad NK y los marcadores de superficie revelaron que, en órganos donde no existían células con el receptor Fc(7S), tampoco existía actividad NK, caso de las amígdalas y timo, mientras que en órganos donde había células con este marcador, también había actividad NK, lo que de nuevo vuelve a confirmar la presencia de este marcador sobre las células NK. Sin embargo, en amígdalas, sí que había una fuerte actividad LICC, lo que nos indicaba que, las células eran viables y activas citotóxicamente y que, la actividad LICC no está asociada a la presencia del receptor Fc(7S), como también ha sido corroborado por otros autores (124, 219). La actividad NK también está ausente en el timo, aunque este órgano presenta como único marcador su roseteo con SRBC; sin embargo, no es de extrañar la ausencia de esta actividad NK, primero, porque carece de células con receptores Fc(7S) y además porque tampoco presenta LICC, que se sabe que es debida a células T, no Fc(7S)⁺, T_M, lo que probablemente nos indica que para llevar a cabo esta actividad citotóxica es necesario la presencia de células efectoras maduras.

Otro punto importante que se asocia con los estudios en los distintos órganos linfoides, es la misma distribución que presentan las actividades NK y ADCC, estando ambas presentes en sangre y bazo pero ausentes en timo y amígdalas.

Estos datos, con las observaciones previas de que ambas poblaciones tienen receptores similares (132,141,220,221) vuelve a plantear la cuestión de la exacta relación entre las células efectoras NK y las células K. La similitud entre las actividades NK y ADCC que ha sido estudiada por diferentes autores, abarca, en humanos, desde la identidad en los marcadores de superficie, siendo ambas células Fc(7S) con baja afinidad para los SRBC, y que bajo ciertas condiciones son sensibles a un antisuero anti T (138, 142), hasta su idéntica distribución en los individuos con alta o baja actividad citotóxica (163,164). Sin embargo, comenzaron a aparecer como fenómenos independientes al estudiar la actividad NK y ADCC de poblaciones T_G o de células $Fc(7S)^+$. Al estudiar estas poblaciones (Resultados III, 1.3), se vio que, mientras que las T_G y $Fc(7S)^+$ presentaban una fuerte actividad NK, la ADCC estaba ausente; lo que nos quería decir, o bien que eran diferentes poblaciones, o bien que siendo la misma población, su mecanismo citotóxico era distinto.

El mecanismo lítico de las células K se realiza a través de la unión de su receptor Fc con la IgG pegada a la célula diana. Si consideramos que, para la purificación de estas subpoblaciones necesitamos que interaccionen a través de sus Fc(7S) con los hematíes sensibilizados EA(7S), éstos bloquearían los receptores y por lo tanto el mecanismo ADCC.

Diversos autores han demostrado que, tras la interacción del receptor Fc con su ligando, las células liberan este receptor al medio, con lo que se transforman en células $Fc(7S)^-$ (212, 223, 224). Para algunos autores este receptor no reaparece tras la incubación de las células a 37°C (220, 224), mientras que para otros, por el contrario, recuperan el receptor y son capaces de formar rosetas EA(7S), aunque tanto en nuestro laboratorio (comunicación personal del Dr. J. Rodríguez Molina) como en otros (220), este punto no ha sido en absoluto corroborado. Ultimamente algunos autores tienden a pensar que, bajo ciertas condiciones, es posible recuperar parte de estos receptores al incubar las células que previamente lo habían perdido en un medio con altas concentraciones de este receptor (223, 224). Esto tampoco quiere decir que la célula NK no pueda provenir de células $Fc(7S)^-$, como ha sido demostrado tanto con células de sangre (225) como de amígdalas (comunicación personal del Dr. M. López Botet), aunque para ello se necesitan condiciones especiales, tales como, periodos mas largos de incubación (alrededor de 7 días) y quizás (?) la presencia de algún factor de crecimiento. De esta manera, la ausencia de actividad ADCC en las T_G y $Fc(7S)^+$, se puede explicar más logicamente por el diferente mecanismo lítico de ambas actividades citotóxicas.

Una de las posibilidades del mecanismo lítico del sis

tema NK, era que esta actividad se lleva a cabo a través de un mecanismo ADCC, en que los linfocitos efectores NK están prearmados con anticuerpos a través de los cuales reconocen a la célula diana. Esta idea, defendida principalmente por Takasugi (226), está actualmente rechazada. Entre otros experimentos cabe destacar para eliminar esta posibilidad, el propio hecho de que células que hayan liberado sus receptores Fc(7S), como las T_G , mantengan todavía actividad NK (Resultados III 1,3). También Koren y col. (229), demostraron que pacientes con agammaglobulinemia poseían esta actividad NK, estos pacientes al no tener anticuerpos no pueden prearmar las células efectoras. Kay y col. (227) muestran que, tras el tratamiento con tripsina de las células efectoras, que elimina las posibles Igs citofílicas de membrana, no es capaz de rearmar con diferentes antisueros a las células efectoras. Por último, otros autores han eliminado la posibilidad de armar a las células efectoras a través de las IgG producidas durante el ensayo citotóxico (227).

Todos estos experimentos descartan la acción de un mecanismo ADCC para explicar la citotoxicidad NK, pero no correlacionan a ambos tipos de células efectoras. Tras los resultados III. 2, nosotros tenemos fuertes evidencias para creer que la actividad NK y ADCC en humanos, está mediada por la misma población de células. Nuestra primera línea

de evidencia, se basa en el empleo de la inhibición de la citotoxicidad usando células frías. Este tipo de ensayo, que fué primariamente descrito por Landazuri y Herberman (210), ha probado ser un excelente método en el estudio de la citotoxicidad celular (CML). Este ensayo, sólo detecta inhibición de la actividad citotóxica cuando las células diana frías expresan los mismos antígenos contra los cuales las células efectoras iban dirigidos. En nuestro caso, observamos una inhibición de un sistema ADCC, por medio de células diana sensibles a NK, lo que nos indica, que la misma población estaba compitiendo por las células diana. Es importante, sin embargo, en estos experimentos, eliminar dos posibles artefactos, que también pueden causar la inhibición, a) la posible formación de nuevos complejos entre las células diana frías y la célula efectora a través de anticuerpos que se hayan podido soltar de la célula diana marcada, y 2) la presencia de células diana competidoras con receptores Fc(7S), que podrían unirse a la célula diana marcada y recubierta de anticuerpos, bloqueando así la acción de la célula efectora. Nosotros eliminamos estas dos posibilidades usando células diana de ratón para el ensayo ADCC, y como células competidoras frías, células E-14, que carecen de receptores Fc(7S). Todos estos experimentos nos inducen a pensar que la explicación más probable de la inhibición es que ambas actividades citotóxicas compartan la misma célula efectora. Usando un sistema murino, Ojo y Wigzell

(228), obtuvieron resultados similares. Ambos trabajos, sin embargo, discrepan con los de Koren y Williams (229), aunque estos autores usan para el sistema de inhibición células diana frías poco sensibles a la actividad NK, como las líneas HSB y MOLT-4 (HSB en nuestras manos también es una pobre inhibidora del sistema ADCC).

Nuestra segunda línea de evidencia se basa, en la adsorción de las células efectoras NK sobre monocapas de células diana sensibles a NK y estudiando si también se retenían en la monocapa las células K. Para poder realizar este tipo de experimentos, es necesario formar monocapas estables y confluente de células sensibles a NK, dado que ninguna de las células diana a NK eran adherentes al plástico. La formación de estas monocapas no había tenido demasiado éxito, incluso con el uso de poli-L-lisina, que se conocía que era capaz de adherir células eritroides al plástico, ya que, usando este método (230), las células tumorales no quedaban bien adheridas y no formaban monocapas confluentes (209). Nosotros, recientemente, describimos la formación de monocapas de células no adherentes al plástico cuando estas se unían, a través de una molécula puente (nosotros usamos PHA), a un soporte sólido (209). Con el uso de esta técnica, nosotros pudimos estudiar y adsorber tanto células citotóxicas específicas, CTL, como células efectoras NK (231).

La unión de las células NK a las células diana, fenómeno que se conoce como formación de conjugados, ha sido descrito por diferentes autores. Roder y Kiessling (232), han demostrado que, bajo determinadas condiciones, linfocitos de ratones no inmunes forman conjugados con determinadas células tumorales (linfocitos que él denomina TBC, "target binding cell"), Targan, estudiando la formación de conjugados, estudia la fracción de los mismos que son efectivos en citotoxicidad NK (233, 234), Shortman y Golstein (235), estudian los requerimientos necesarios para que ocurra el reconocimiento, y Grim y col.(236) y Zagury y col.(237), estudian a fondo la cinética de lisis en células CTL, tras la formación de los conjugados.

Todos estos autores, coinciden en la correlación entre la frecuencia de las células formando conjugados y los niveles de actividad citotóxica tanto en sistemas de citotoxicidad específica como espontánea. Roder y col.(238), además ha logrado aislar ciertas estructuras de la célula diana que inhiben la formación de conjugados en un sistema NK, lo que sugiere que las células NK, están equipadas con receptores, capaces de reconocer determinadas estructuras que poseen únicamente las células diana NK. Esta misma técnica también ha sido empleada, recientemente, por Saskela y col.(160), para aislar y purificar a las células efectoras NK por sedimentación de los conjugados en un gradiente de Percoll.

En nuestras manos, la adsorción de las células NK sobre las monocapas, nos permitió comprobar como, al eliminar las células adherentes a K562, se eliminaba, no solo la actividad NK, sino también la ADCC, con lo que apoya la hipótesis de una misma población celular llevando a cabo ambas actividades citotóxicas. También, hemos empleado la técnica de formación de conjugados, para la perfecta identificación, por marcadores de superficie, de las células linfoides que forman conjugados, o para estudiar el mecanismo de acción del INF sobre la citotoxicidad espontánea.

En cualquier caso, comprobamos como esta unión es muy rápida (menos de 10 min. son suficientes para formar los conjugados o para adsorber la actividad NK en las monocapas), y los conjugados eran muy estables, lo que coincide con otros autores, que encuentran como estos son capaces de soportar repetidos pipeteos y manipulaciones (232).

En los estudios sobre el efecto del INF sobre la actividad NK, se confirmó de nuevo un aumento significativo de esta actividad tras la preincubación "in vitro" de los leucocitos con el INF, tal como ha sido descrito previamente (175-179).

Al estudiar el efecto del INF, comprobamos, como éste

era capaz de aumentar la actividad NK, no sólo frente a células diana sensibles a NK, como las líneas K562 y MOLT-4, sino que también es capaz de inducir la citotóxicidad frente a células diana no sensibles a NK, tanto en ensayos de 4 horas como de 18 horas. Este aumento en el rango de especificidades fué también observado por Zarling y col.(239); estos autores comprobaron como el tratamiento de los linfocitos con INF, era capaz de inducir la lisis frente a células diana leucemicas no establecidas como líneas de cultivo "in vitro".

Uno de los problemas en los estudios de la activación por INF de la actividad NK, es tratar de averiguar como se lleva a cabo dicha activación. Nosotros comprobamos que, tras el tratamiento con distintas dosis de INF, el número de conjugados entre los linfocitos y las células diana, permanecía constante; es decir, el INF no aumenta el número de células formando conjugados. Sin embargo, a través de la técnica de formación de conjugados citotóxicos en agar, comprobamos como el INF es capaz de aumentar el número total de conjugados citotóxicos. Es decir, el INF el paso de células Pre-NK (denominadas así por Targan y col.(234), como aquellas células que formando conjugados no eran capaces de lisar a la célula diana) a células NK-activas (linfocitos que mataban a su célula diana). Para Saskela y col.(240). y para Herberman y col.(132), el INF actúa, reclutando nuevas células no citotó-

xicas, y que ellos llaman Pre-NK y las transforma en células NK-maduras (de todas maneras, los terminos empleados por estos autores no son identicos a los nuestros, ya que para ellos células NK-maduras sólo son aquellas que se absorben en una monocapa de células fibroblastos, sistemas que nosotros no hemos estudiado).

Tras la incubación del INF, con las células efectoras y su ensayo frente a K562 en un sistema de conjugados citotóxicos en agar, comprobamos un doble fenómeno: por un lado, hay un rapido incremento en la cinetica de lisis. así, mientras que en condiciones normales la actividad citotóxica comienza a los pocos minutos y sube gradualmente hasta alcanzar un techo maximo al cabo de las dos horas de ensayo. tras la preincubación con INF, las células efectoras presentan un rapido incremento de la lisis. llegando a los valores máximos en pocos minutos de ensayo citotóxico. El segundo fenomeno es el aumento del porcentaje total de conjugados citotóxicos, aumentando desde un 2.3% en células no tratadas hasta un 4.5% en las células con INF, sobre el total de leucocitos

El efecto del INF sobre la actividad NK, está en función del tiempo y de la concentración de INF, así. al aumentar la concentración de INF es necesario un menor tiempo de activación para obtener un aumento de la citotóxicidad NK.

Esto está de acuerdo, al menos en parte, con Senik y col. (que comprueban como el aumento de la actividad NK estaba en función de la concentración de INF. También comprobamos como la activación de las células por INF es un efecto reversible, bajo condiciones normales de tratamiento, las células se mantenían con una alta actividad NK durante 6 horas, tras lo cual, las células caían a sus controles normales de actividad; sin embargo, estas células son capaces de volver a activarse si de nuevo se las vuelve a incubar con nuevo INF, lo que nos indica que las células NK se pueden reciclar y que el INF no lleva a las células a un estadio final de diferenciación.

Otro punto importante es el hecho de que, la activación de la célula NK por INF, no puede realizarse si los linfocitos están formando conjugados; el mecanismo de bloqueo no está en absoluto claro, aunque deben destacarse varios puntos. Una posibilidad es que el INF actúe sobre la célula diana, tal como ha sido descrito por Tricheri y col. (17.7), y que induzca sobre esta una resistencia a la lisis por la célula efectora; este punto, fué en principio descartado al comprobar el efecto directo del INF, a bajas concentraciones, sobre las células K562, sin embargo, los últimos trabajos de Saskela y col. (241), mencionan el hecho de que el K562 es un potente productor de INF, incluso, al entrar en contacto con la célula efectora, con lo que habría que descartar la posibili-

dad de acción de este nuevo INF sobre las células diana.

El INF es capaz de inducir un aumento de la actividad NK sólo en aquellas poblaciones que ya poseían actividad citotóxica. El tratamiento de los linfocitos T, no T, y $\text{Fc}(7\text{S})^+$, con INF, induce un aumento de la actividad NK, mientras que este aumento no es detectable en poblaciones $\text{Fc}(7\text{s})^-$. Idénticos resultados se obtuvieron sobre las diferentes fracciones de un gradiente de Percoll; sólo aquellas fracciones con alguna actividad NK podían ser aumentadas por el INF. Es más, fracciones de alta densidad y bajo contenido en LGL, presentan conjugados, aunque no actividad NK, ni tras el tratamiento con INF. Esto coincide también con los resultados de los conjugados citotóxicos en que tras el tratamiento con INF, y al cabo de tres horas de ensayo citotóxico, quedan todavía más de un 50% de células formando conjugados que no son citotóxicas, lo que de nuevo nos indica que, no todas las células que forman conjugados son citotóxicamente activas, al menos por la adición de INF.

Por último, hay que destacar el hecho de poder purificar células LGL, casi puras, en un gradiente discontinuo de Percoll, tal como ha sido recientemente descrito por Saskela y col.(20). Debido a su determinada morfología y densidad, las células LGL, flotan a una determinada densidad de Percoll,

la que se pueden recojer con una pureza casi total (90%)
células con morfología LGL.

La posibilidad de tener células efectoras NK, casi puras, puede permitir, la obtención de células $Fc(7S)^+$, sin que se haya interaccionado su receptor Fc, lo que permitiría esclarecer muchas de las discusiones sobre el papel de este receptor; además, se podría intentar expandir, a través de determinados factores de crecimiento como el TCGF (células NK, lo que a su vez permitiría la obtención de clones celulares, que nos permitirían conocer la especificidad real de esta actividad citotóxica, su mecanismo de lisis, así como su posible papel en la defensa del organismo, como vigilante inmunológico, frente a una variedad de sistemas tumorales.

V. CONCLUSIONES

- 1) La célula efectora en citotoxicidad espontánea, es una célula linfocítica, con receptores Fc(7S), y se encuentra repartida entre las fracciones T_G y "null".
- 2) Tanto leucocitos de sangre como el bazo tienen actividad NK, mientras que está ausente en timo y amígdalas, órganos que además carecen de células con receptores Fc(7S)
- 3) El receptor Fc(7S), no es necesario para llevar a cabo la citotoxicidad espontánea, así, células que tengan bloqueado este receptor, como las T_G , presentan actividad NK aunque carecen de actividad ADCC.
- 4) Las células efectoras NK, tienen morfología de linfocitos grandes granulares (LGL), frente a todas las líneas diana ensayadas; las células LGL pueden enriquecerse en un gradiente discontinuo de Percoll.
- 5) La formación de monocapas de células diana no adherentes al plástico, ha permitido la adsorción de células efectoras NK, con pérdida de la actividad NK en la población no adherente.

- 6) Por ensayos de inhibición de un sistema de citotóxicidad ADCC con células sensibles a NK, y por estudios de adsorción sobre monocapas de células diana sensibles a NK, podemos concluir que, las células efectoras en citotoxicidad Nk y ADCC, pertenecen, en humanos, a la misma población celular.
- 7) El INF aumenta la actividad citotóxica espontánea, y este aumento es debido al aumento en el porcentaje de conjugados citotóxicos. El INF no aumenta el porcentaje de conjugados totales.
- 8) El INF aumenta la velocidad de la lisis de las células efectoras. Tras el tratamiento con INF, los linfocitos efectoras matan mas rapidamente a sus células diana.
- 9) El INF aumenta el rango de especificidades de la célula efectora NK; células diana resistentes a la citotóxicidad NK en ensayos de 4 horas, son lisadas por los linfocitos pretratados con INF.
- 10) El efecto del INF es reversible. Linfocitos que habian sido activados por INF, pierden la capacidad de aumentar la citotóxicidad NK, tras un determinado periodo de tiempo de incubación, pudiendo reactivarse con nuevo INF.

- 11) No todas las células formando conjugados son citotóxicas frente a células diana NK, ni incluso aunque estas se preincuban con INF
- 12) El INF es capaz de aumentar la actividad citotóxica NK en todas aquellas poblaciones celulares que tengan dicha actividad citotóxica

VI. BIBLIOGRAFIA

1. J. SPRENT (1977) En: "The Lymphocyte: Structure and Function". Ed. J.M. Marchalonis, Marcel Dekker, Inc., N.Y.
2. J.L. GOWANS y D.D. MCGREGOR (1965) Progr. Allergy 9, 1.
3. J.F.A.P. MILLER, A. BASTEN, J. SPRENT y C. CHEERS (1971) Cell. Immunol. 2, 469.
4. M.C. RAFF (1971) Transplant. Rev. 6, 52.
5. A. BASTEN, J.F.A.P. MILLER, J. SPRENT y J. PYE (1972) J. Exp. Med. 135, 610.
6. J.A. GALLY (1973) En: "The Antigens" Vol. I, pp. 162, Ed. M. Sela, Acad. Press, N.Y.
7. G.D. SNELL, J. DAUSSET y S. NATHANSON (1976) En: "Histocompatibility". Acad. Press, N.Y.
8. J. KLEIN (1975) En: "Biology of the Mouse Histocompatibility-2 Complex". Springer Verlag, Berlin.
9. B.A. CUNNINGHAM (1977) En: "The Structure and Function of Histocompatibility Antigens". Sci. Am. 237, 96.
10. I.L. WEISSMAN (1967) J. Exp. Med. 126, 291.
11. G. MOLLER (Ed.) (1975) Transplant. Rev. 24.
12. J.L. GOWANS y E.J. KNIGHT (1964) Proc. R. Soc. Lond. (Biol.) 159, 257.

13. J.L. WEISMAN, G.A. GUTMAN y S.H. FRIEDBERG (1974) Ser. Immunol. 8, 482.
14. K.H. KATZ, J.M. DAVIE, W.E. PAUL y B. BENACERRAF (1971) J. Exp. Med. 134, 201.
15. N.A. MITCHINSON (1969) Symp. Int. Soc. Cell. Biol. 7, 29.
16. J.J. MARCHELONIS y R.E. CONE (1973) Transplant. Rev. 14, 3.
17. G.F. SCHREINER y E.R. UNANUE (1976) Adv. Immunol. 24, 38.
18. M. BURNET (1959) En: "The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity". University Press, Cambridge, England.
19. E.S. VITETTA y J.W. UHR. (1973) Transplant. Rev. 14, 50.
20. G.M. EDELMAN (1973) Science 180, 830.
21. A. NISSONOFF, J.E. HOPPER y J.B. SPRING (1975) Eds. En: "The Antibody Molecule". Acad. Press, N.Y.
22. D.R. STANWORTH y M.W. TURNER (1978) En: "Handbook of Experimental Immunology". Ed. D.M. Weir, Blackwell Scientific Publications.
23. J.A. HERZENBERG y L.A. HERZENBERG (1978) En: "Handbook of Experimental Immunology". Ed. D.M. Weir, Blackwell Pub.
24. J.A. GALLY (1973) En: "The Antigens" Vol. I, pp. 162, Ed. M. Sela, Acad. Press, N.Y.
25. J. OUDIN (1966) Proc. Roy. Soc. Ser. B166, 207.
26. J. OUDIN y P.A. CAZENAVE (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 261.

27. H. HENGARTNER y T. MEO (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4494.
28. N. HOZUMI y S. TONEGAWA (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3629.
29. P. GOTTLIEB (1980) Molec. Immunol. 17, 1423.
30. A.J. CUNNINGHAM (1976) En: "Generation of Antibody Diversity". Acad. Press, N.Y.
31. M. COHN (1974) Progress. Immunology II, 261.
32. G. MOLLER (1973) Transplant. Rev. 14.
33. J.J. MARCHALONIS (1975) Science 190, 20.
34. D. KATZ (1977) En: "Lymphocyte Differentiation, Recognition and Regulation". Eds. F.J. Dixon y H. Kunkel, Acad. Press, N.Y.
35. A.K. ABBAS, E.R. UNANUE y M.J. KARNOVSKY (1976) Tech. Biochem. Biophys. Morphol. 3.
36. G. MOLLER (1961) J. Exp. Med. 114, 415.
37. R.B. TAYLOR, W.P.H. DUFFUS, M.C. RAFF y S. DE PETRIS (1971) Nature 258, 617.
38. P. LOBO, F.B. WESTERVELT y D.A. HORWITZ (1975) J. Immunol. 114, 116.
39. R.J. WINCHESTER, S.M. FU, T. HOFFMAN y H.G. KUNKEL (1975) J. Immunol. 114, 1210.
40. J.W. UHR (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 1599.
41. V.A. BOKISCH y A.T. SOBEL (1974) J. Exp. Med. 140, 1336.
42. A. EDEN, G.W. MILLER y V. NUSSENZWEIG (1973) J. Clin. Invest. 52, 3239.

.

59. J.A. WALDRON, R.G. HORN y A.S. ROSENTHAL (1973) J. Immunol. 111, 58.
60. E-L. LARSSON, A. COUTINHO y C. MARTINEZ (1980) Immunol. Rev. 51, 61.
61. M. GLASER, H. KIRCHNER, H.T. HOLDEN y R.B. HERBERMAN (1976) J. Natl. Canc. Inst. 56, 865.
62. R. KELLER (1975) En: "Mononuclear Phagocytes in Immunity Infection and Pathology". Ed. R. van Furth, p. 857, Blackwell, Oxford.
63. L.J. OLD, E.A. BOYSE y E. STOCKERT (1963) J. Natl. Canc. Inst. 31, 977.
64. B. STUCK, E.A. BOYSE, L.J. OLD y E.A. CARSWELL (1964) Nature (London) 203, 1033.
65. A.E. REIF y J.M.V. ALLEN (1964) J. Exp. Med. 120, 413.
66. J.P. LAMELIN, B. LISOWKA-BERNSTEIN, A. MATTER, J.E. RYSER y P. VASSALLI (1972) J. Immunol. 101, 99.
67. E.M. LANCE, S. COOPER y E.A. BOYSE (1970) Cell. Immunol. 1, 536.
68. G. MOLLER (1978) Immunol. Rev. 42.
69. L. CHESSE y S.F. SCHLOSSMAN (1977) En: "Contemporary Topics in Immunology". Ed. O. Stutman, Plenum Press, N.Y., 7, p. 363.
70. E.L. REINHERZ, P.C. KUNG, G. GOLDSTEIN, R.H. LEVEY y S.F. SCHLOSSMAN. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1588.
71. P.C. KUNG, G. GOLDSTEIN, EL. REINHERZ y S.F. SCHLOSSMAN

- (1979) *Science* 206, 347.
72. E.L. REINHERZ, P.C. KUNG, G. GOLDSTEIN y S.F. SCHLOSSMAN
(1979) *J. Immunol.* 123, 1312.
73. R.L. EVANS, J.M. BREARD, H. LAZARUS, S.F. SCHLOSSMAN y
L. CHESSE (1977) *J. Exp. Med.* 145, 221.
74. E.L. REINHERZ, P.C. KUNG, G. GOLDSTEIN y S.F. SCHLOSSMAN
(1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4061.
75. J.F. BACH, J. DORMONT, M. DARDENNE y H. BALNER (1969)
Transplantation 8, 265.
76. P. BRAIN, J. GORDON y W.A. WILLETS (1970) *Clin. Exp. Immunol.* 6, 681.
77. E-L. LARSSON, J. ANDERSSON y A. COUTINHO (1978) *Eur. J. Immunol.* 8, 693.
78. A. SILVA, M. LOPEZ-BOTET, J. ALVAREZ y M.O. LANDAZURI (1981)
En prensa.
79. W. WEST, R.B. BOOZER y R.B. HERBERMAN (1978) *J. Immunol.*
120, 90.
80. L. MORETTA, M. FERRARINI, M.L. DURANTE y C. MINGARI (1975)
Eur. J. Immunol. 5, 565.
81. M. FERRARINI, L. MORETTA, C. MINGARI, P. TONDA y B. PERNIS
(1976) *Eur. J. Immunol.* 6, 520.
82. E.L. REINHERZ, L. MORETTA, M. ROPER, J.M. BREARD, M.C.
MINGARI, M.D. COOPER y S.F. SCHLOSSMAN (1980) *J. Exp. Med.*
151, 969.

83. J. BREARD, L. REINHHERZ, P.C. KUNG, G. GOLDSTEIN y S.F. SCHLOSSMAN (1980) J. Immunol. 124, 1943.
84. M. FERRARINI, L. MORETTA, R. ABRILE y M.L. DURANTE (1975) Eur. J. Immunol. 5, 70.
85. S. GUPTA (1979) J. Immunol. 126, 2664.
86. C.D. PLATSOUKAS, R.A. GOOD y S. GUPTA (1980) Cell. Immunol. 51, 238.
87. L.G. LUM, A.U. MUCHMORE, D. KEREN, J. DECKER, I. KOSKI, W. STROBER y R.M. BLAESE (1979) J. Immunol. 122, 65.
88. J. YODOI y K. ISHIZAKA (1979) J. Immunol. 122, 2577.
89. A.J.S. DAVIES, E. LEUCHAR, V. WALLIS, R. MARCHANT y E.V. ELLIOT (1967) Transplantation 5, 222.
90. J.F.A.P. MILLER y G.F. MITCHELL (1967) Nature (London) 216, 659.
91. G.F. MITCHELL y J.F.A.P. MILLER (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 296.
92. F.H. BACH, M.L. BACH y P.M. SONDEL (1976) Nature (London) 259, 273.
93. L. MORETTA, S.R. WEBB, C.E. GROSSI, P.M. LYDYARD y M.D. COOPER (1977) J. Exp. Med. 146, 184.
94. B.F. HAYNES y A. FAUCCI (1978) J. Immunol. 121, 559.
95. T.A. WALDMAN, M. DURM, S. BRODER, S. BLACKMAN, R.M. BLAESE y W. STROBER (1974) Lancet ii, 609.
96. Y.M. FAKULE y B.M. GREENWOOD (1976) Lancet ii, 608.

97. H. CANTOR y E.A. BOYSE (1975) J. Exp. Med. 141, 1376.
98. P.C.L. BEVERLEY, J. WOODY, M. DUNKLEY, M. FELDMAN y I. MCKENZIE (1976) Nature 262, 495.
99. M. NABHOLZ y V. MIGGIANO (1977) En: "B and T Cells in Immune Recognition". Eds. F. Looz y G.E. Roelants, 12, p. 261.
100. F.H. BACH y K. HIRSCHHORN (1964) Science 143, 813.
101. B. BAIN, M.R. VAS y L. LOWENSTEIN (1964) Blood 23, 108.
102. F.H. BACH y N.K. VOYNOW (1966) Science 153, 545.
103. S. KASAKURA y L. LOWENSTEIN (1965) En: "Histocompatibility Testing". Ed. B. Amos y J. van Rood, Munksgaard, Copenhagen, p. 203.
104. F.H. BACH, M.L. BACH y P.M. SONDEL (1976) Nature 259, 273.
105. K. FISCHER-LINDAHL (1979) En: "Natural and Induced Cell-Mediated Cytotoxicity". Ed. G. Reithmüller, P. Wernet y G. Cudkowicz, Acad. Press, N.Y., p. 117.
106. G.D. SNELL, J. DAUSSET y S. NATHENSON (1976) En: "Histocompatibility". Eds. G.D. Snell, J. Dausset y S. Nathenson, Acad. Press, N.Y., p. 154.
107. F.H. BACH, M. SEGALL, K. STOUBER, P. SONDELL, B. ALTER y M. BACH (1973) Science 180, 403.
108. R.M. ZINKERNAGEL y P.C. DOHERTY (1973) J. Exp. Med. 138, 1266.

109. H. WALDMAN, H. POPE, L. BRENT y K. BIGHOUSE (1978)
Nature 274, 166.
110. J. SPRENT (1978) J. Exp. Med. 148, 1838.
111. B. BENACERRAF y I. GREEN (1969) Ann. Rev. Med. 20, 141.
112. A.J. CROWLE (1975) Adv. Immunol. 20, 197.
113. J.B. WINFIELD, P. LOBO y M.E. HAMILTON (1977) J. Immunol.,
119, 1778.
114. M. FERRARINI, A. CADONI, R. DiPRIMIO, A. ZICCA, A. LEPRINI,
A. FRANZI y C.E. GROSSI (1980) Seminars in Immunopath. En
prensa.
115. J.R. KALDEN, H.H. PETER, R. ROUBIN y J.P. CESARINI (1977)
Eur. J. Immunol. 8, 537.
116. M. FERRARINI, A. CARDONI, A. FRANZI, C. GHIGLIOTTI, A.
LEPRINI, A. ZICCA y C.E. GROSSI (1980) Eur. J. Immunol.
10, 562.
117. G.D. BONNARD y W. WEST (1979) En: "Immunodiagnosis of
cancer". Eds. R.B. Herberman y K.R. McIntire, Publica-
ciones Marcel Dekker, N.Y.
118. P. PERLMAN (1976) En: "Clinical Immunobiology", Vol. 3,
Eds. F.H. Bach y R.A. Good, Acad. Press, N.Y., p. 107.
119. I.C.M. McLENNAN (1976) En: "Clinical Tumor Immunology".
Eds. J. Wybran y M.J. Staquet, Pergamon Press, Oxford, p. 47.
120. G. TRINCHIERI, P. BAUMANN, M. de MARCHI y Z. TOKES (1975)
J. Immunol. 115, 249.
121. H.R. McDONALD y G.D. BONNARD (1975) Scand. J. Immunol. 4,
129.

122. J.C. CEROTTINI y K.T. BRUNNER (1974) Adv. Immunol. 18, 67.
123. B. BONAVIDA, A. ROBINS y A. SAXON (1977) Transplantation 23, 261.
124. L. SINCHOWITZ y P.H. SCHUR (1976) Immunology 31, 303.
125. R.P. MACDERMOTT, G.S. NASH y D. BOLDT (1976) J. Immunol. 117, 1890.
126. R.P. MACDERMOTT, G.S. NASH, J.G. SAINT, E.A. CLARK, A. ZARAS y D. BOLDT (1976) J. Immunol. 117, 1402.
127. F. WISLOFF, S.S. FROLAND y T.E. MICHAELSEN (1974) Int. Arch. Allergy. 47, 488.
128. G. CORDIER, C. SAMARUT y G.P. REVILLARD (1978) Immunology 35, 49.
129. D.L. NELSON, B.M. BUNDY, T.D. WEST y W. STROEBER (1976) Cell. Immunol. 23, 89.
130. A. DURANTEZ, M. O. DE LANDAZURI, J. ALVAREZ y A. SILVA (1978) Abstr. 4th Europ. Immunol. Meeting, Budapest, p. 39.
131. R. B. HERBERMAN y H.T. HOLDEN (1979) En "Natural cell mediated immunity, Advances in Cancer Research". Eds. G. Klein y S. Weinhouse, Acad. Press. N.Y.
132. R.B. HERBERMAN, J.Y. DJEU, H.D. KAY, J.R. ORTALDO, C. RICCARDI, G.D. BONNARD, H.T. HOLDEN, R. FAGNANI, A. SANTONI y P. PUCCETTI. (1979) Immunol. Rev. 44.
133. R.B. HERBERMAN (1973) Natl. Cancer Inst. Monogr. 37, 217.
134. W.H. WEST, G.B. CANNON, H.D. KAY, G.D. BONNARD y R. B.

- HERBERMAN (1976) J. Immunol. 118, 355.
135. R.P. MACDERMOTT, L. CHESS y S.F. SCHOLSMAN (1975) Clin. Immunol. Immunopathol. 4, 415.
136. W. DOMWIG y M.L. LOHMANN-MATTHES (1979) Eur. J. Immunol. 9, 261.
137. R.B. HERBERMAN (1978) En "The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research" Eds. J. Fogh y B. Giovanella. Acad. Press. N.Y. pp. 136.
138. R.B. HERBERMAN, M.E. NUNN, y H.T. HOLDEN (1978) J. Immunol. 121, 304.
139. K. KOMURO, K. ITAKURA, E.A. BOYSE y M. JOHN (1975) Immunogenetics, 1, 452.
140. H. CANTOR, M. KASAI, F.W. SHEN, J.C. LECLERC y L. GLIMCHER (1979) Immunol. Rev. 44, 3.
141. W.H. WEST, G.B. CANNON, H.D. KAY, G.D. BONNARD y R. B. HERBERMAN (1977) J. Immunol. 118, 355.
142. J. KAPLAN y D.M. CALLEWAERT (1978) J. Natl. Cancer Inst. 60, 961.
143. R.B. HERBERMAN (1980) En "Natural Cell-Mediated Immunity Against Tumors" Acad. Press. pp. 277.
144. R.B. HERBERMAN, M.E. NUNN, H.T. HOLDEN y D.H. LAVRIN (1975) Int. J. Cancer. 16, 230.
145. R. KIESSLING, E. KLEIN, H. PROSS y H. WIGZELL (1975) Eur. J. Immunol. 5, 117.
146. G.R. SHELLAM (1977) Int. J. Cancer. 19, 225.

147. O. EREMIN (1980) En "Natural Cell-Mediated Immunity Against Tumors" Ed R.B. Herberman. Acad. Press. pp. 59.
148. D.L. NELSON, B. BUNDY, H.E. PITCHON, R.M. BLAESE y W. STROEBER (1976) J. Immunol. 117, 1472.
149. R.B. HERBERMAN, M.E. NUNN, H.T. HOLDEN, S. STAAL y J.Y. DJEU (1977) Int. J. Cancer. 19, 555.
150. J.R. OEHLER, L.R. LINSAY, M.E. NUNN y R.B. HERBERMAN (1978) Int. J. Cancer. 21, 204.
151. H.F. PROSS y M. JONDAL (1975) Clin. Exp. Immunol. 21, 226.
152. O. EREMIN, R.R.A. COOMBS, D. PLUMB y ASHBY (1978) Int. J. Cancer. 21, 42.
153. M. KIUCHI y M. TAKASUGI (1976) J. Natl. Cancer Inst. 56, 575.
154. M.E. NUNN, J.Y. DJEU, M. GLASER, D.H. LAVRIN y R.B. HERBERMAN (1976) J. Natl. Cancer Inst. 56, 393.
155. A. LEVIN, R. MASSEY, F. DEINHARDT, V. SCHAUFE y J. WOLTER (1975) En "Neoplasm Immunity: Theory and Application". Ed. Crispen. ITR. Chicago. p. 107.
156. J.E. DEVRIES, S. CORNAIN, y P. RUMKE (1974) Int. J. Cancer. 14, 427.
157. L. GLIMCHER, F.W. SHEN, y H. CANTOR (1977) J. Exp. Med. 145, 1.
158. M. KASAI, M. IWAMORI, Y. NAGAI, K. OKUMURA y T. TADA (1980) Eur. J. Immunol. 10, 175.

159. J. DURDICK, B.N. BECK y C.S. HENNEY (1980) En "Natural Cell-Mediated Immunity Against Tumors" Ed. R. B. Herberman Acad. Press. N.Y. p. 37.
160. E. SASKELA, T. TIMONEN, A. RANKI, y P. HAYRY (1979) Immunol. Rev. 41, 71.
161. T. TIMONEN, E. SASKELA, A.M. RANKI y P. HAYRY (1979) Cell. Immunol. 48, 133.
162. E. SASKELA, y T. TIMONEN (1980). En "Natural Cell-Mediated Immunity Against Tumors". Ed. R.B. Herberman. Acad. Press. N.Y. p. 173.
163. O. HALLER, R. KIESSLING, A. ORN, K. KARREN, K. NILSSON y H. WIGZELL (1977) Int. J. Cancer. 20, 93.
164. R.C. HARMON, E. CLARK, C. O'TOOLE y L.S. WICKER (1977) Immunogenetics. 4, 601.
165. R.M. WELSH, R.M. ZINKERNAGEL Jr. y L.A. HALLENBECK (1978)
166. A. HATZFELD, G.C. KOO y E.A. BOYSE (1980) Abstrac. 4th Internat. Congress Immunol. Paris.
167. J.R. OEHLER y R.B. HERBERMAN (1978) Int. J. Cancer. 21, 221.
168. J.Y. DJEU, J. HEINBAUGH, W.D. VIERA, H.T. HOLDEN y R.B. HERBERMAN (1979) Immunopharmacology 1, 231.
169. R. KIESSLING, G. PETRANYI, G. KLEIN y H. WIGZELL (1975) Int. J. Cancer. 15, 933.

170. G. CUDKOWICZ y P.S. HOCHMAN. (1979) Immunol. Rev. 44, 13.
171. D. SANTOLI, G. TRINCHIERI, C.M. ZMIJEWSKI y H. KOPROWSKI
(1976) J. Immunol. 117, 765.
172. G. REITHMULLER, G.R. PAPE, M. HADAM y J.G. SAAL (1980)
En "Natural Cell-Mediated Immunity Against Tumors" Ed.
R.B. Herberman. Acad. Press. N.Y. p. 633
173. S.A. WOLFE, D.E. TRACEY, y C.S. HENNEY (1976) Nature
262, 584.
174. R.M. WELSH, y R.M. ZINKERNAGEL Jr. (1977) Nature 268, 646.
175. J.Y. DJEU, J.A. HEINBAUGH, H.T. HOLDEN y R.B. HERBERMAN
(1978) J. Immunol. 122, 175.
176. J.Y. DJEU, K.Y. HUANG y R.B. HERBERMAN (1980) J. Exp. Med.
151, 781.
177. G.D. TRINCHIERI, D. SANTOLI, R. DEE y R.B. KNOWLES (1978)
J. Exp. Med. 147, 1299.
178. M. GIDLUND, A. ORN, H. WIGZELL, A. SENIK y I. GRESSER
(1978) Nature 223, 259
179. J. HUDDLESTONE, T.C. MERIGAN Jr. y M. B. OLDSTONE (1979)
Nature 282, 417.
180. M. DROLLER, H. BORG y P. PERLMAN (1979) Cell. Immunol. 47,
248 .
181. R.B. HERBERMAN, J. ORTALDO y G.D. BONNARD (1979) Nature
277, 221.
182. S. EINHORN, H. BLOMGREN, y H. STRANDER (1978) Int. J. Cancer.
22, 405.

183. A. ISSACS y J. LINDENMAN (1957) Proc. Roy. Soc. Ser. B.
147, 258.
184. S. COHEN, E. PICK y J.J. OPPENHEIM (Eds) (1979) Acad. Press
N.Y.
185. News and Views (1980) Nature 286, 110.
186. G. ALLEN, y K. FANTES (1980) Nature 287, 408.
187. S. NAGATA, H. TAIRA, A. HALL, L. JOHNSURD, M. STREULI,
J. ECSODI, W. BOLL, K. CANTELL y C. WEISSMAN (1980) Nature.
284, 316.
188. D.V. GEODDEL, E. YELVERTON, A. ULLRICH, H.L. HEYNEKER,
G. MIOZZARI, W. HOLMES, P. SEEBURG, T. DULL, L. MAY, N.
STEBBING, R. CREA, S. MAEDA, R. MACCANDLISS, A. SLOMA, J.
TABOR, M. GROSS, P. FAMILLETTI y S. PESTKA (1980) Nature
287, 316.
189. T. J. PRIESTMAN (1979) Cancer Treatment Rev. 28
190. I. GRESSER (Ed) (1979) En "Interferon-1".
191. G. MOLLER (Ed) (1976) Immunol. Rev. 28
192. F.M. BURNET (1973) Lancett ii, 480.
193. J.E. TALMADGE, K.K. MEYERS, O. J. PRIEUR y J.R. STARKEY
(1980) Nature 284, 622.
194. K. KARRE, G.O. KLEIN, R. KIESSLING, y J. RODER (1980)
Nature 284, 624.
195. J. RODER y A.K. DUWE (1979) Nature 278, 451.
196. J. RODER (1979) J. Immunol. 123, 2168.

197. J. RÖDER, M.L. LOHMANN-MATTHES, W. DOMZIG y H. WIGZELL
(1979) J. Immunol. 123, 2174.
198. J. RÖDER, T. HALIOTIS, M. KLEIN, St. KOREC, J. JETT, J.
ORTALDO, R.B. HERBERMAN, P. KATZ y A. FAUCCI (1980)
Nature, 284, 553.
199. T. HALIOTIS, J. RÖDER, M. KLEIN, J. ORTALDO, A. FAUCCI,
y R.B. HERBERMAN (1980) J. Exp. Med. 151, 1039.
200. M. KLEIN, J. RÖDER, T. HALIOTIS, S. KOREC, J. JETT, R.B.
HERBERMAN, P. KATZ, y A. FAUCCI (1980) J. Exp. Med. 151,
1049.
201. A. BOYUM (1968) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (suppl.
97), 72.
202. G. BERKE y R. LEVEY (1972) J. Exp. Med. 135, 972.
203. M. JONDAL, G. HOLM, y H.J. WIGZELL (1972) J. Exp. Med.
137, 1532.
204. M.A. PELLEGRINO y S. FERRONE (1975) En "First HLA Work-
shop of the Americas", Eds. U.S. Dept. of Health, Education
and Welfare". p 176.
205. J.H. DEAN, J.S. SILVA, J.L. MCCOY, C.M. LEONARD, G.B. CANNON,
y R.B. HERBERMAN (1975) J. Immunol. 115, 1449.
206. M.S. PELLEGRINO, S. FERRONE, S. DIERICH, y R.A. REISFELD
(1974) J. Immunol. Immunopathol. 3, 324.
207. T. TIMONEN y E. SASKELA (1980) J. Immunol. Methods, 36,
285.

208. E. KEDAR, M.O. DE LANDAZURI, B. BONAVIDA y J. FAHEY
(1974) J. Immunol. Methods, 5, 97.
209. A. SILVA, M.O. DE LANDAZURI, J. ALVAREZ, y M. KREISLER
(1978) J. Immunol. Methods 23, 303.
210. M.O. DE LANDAZURI y R.B. HERBERMAN (1972) Nature, 238, 18.
211. E.A, GRIM y B. BONAVIDA (1977) J. Immunol. 119, 1041.
212. G. CORDIER, C. SAMARUT y G.P. REVI_LARD (1977) J. Immunol.
119, 1943.
213. P. BIBERFELD, B. WAHLIN, P. PERLMAN y G. BIBERFELD (1975)
Scand. J. Immunol. 4, 859.
214. M.G. MASUCCI, G. MASUCCI, E. KLEIN, y W. BERTHOLD (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77, 3620.
215. M. FERRARINI, T. HOFFMAN, M. FU, R. WINCHESTER y H. KUNKEL
(1977) J. Immunol. 119, 1525.
216. W.P. PICHLER y W. KNAPP (1978) Scand. J. Immunol. 7, 105.
217. W. WEST, S. PAYNE, J. WEESE y R.B. HERBERMAN (1977) J.
Immunol. 119, 548.
218. Proc. Eleven Leukocyte Culture Conference (1977)
219. A. DURANTEZ, M.O. DE LANDAZURI, A. SILVA, J. ALVAREZ y
M. KREISLER (1979) J. Clin. Lab. Immunol. 2, 59.
220. H.D. KAY, G.D. BONNARD, W.H. WEST, y R.B. HERBERMAN(1977)
J. Immunol. 118, 2058.
221. A. SANTONI, R.B. HERBERMAN y H.T. HOLDEN (1979) J. Natl.
Cancer. Inst. 62, 109.

222. A. SANTONI, R.B. HERBERMAN y H.T. HOLDEN (1979) J. Natl. Cancer Inst. 63, 95.
223. C. SAMARUT y J.P. REVILLARD (1980) Eur. J. Immunol. 10, 352.
224. G. SARMAY, L. ISTVAN, y J. GERGELY (1978) Immunology 34, 315.
225. J.R. ORTALDO, R.P. McDERMOTT, G.D. BONNARD, P.D. KIND y R.B. HERBERMAN (1979) Cell. Immunol. 48, 356.
226. Y. KOIDE y M. TAKASUGI (1977) Int. J. Cancer Inst. 59, 1099.
227. H.D. KAY, G.D. BONNARD y R.B. HERBERMAN (1979) J. Immunol. 122, 675.
228. E. OJO, y H. WIGZELL (1978) Scand. J. Immunol. 7, 297.
229. H.S. KOREN y M.S. WILLIAMS (1978) J. Immunol. 121, 1956.
230. D. STULTING y G. BERKE (1973) J. Exp. Med. 137, 932.
231. M.O. DE LANDAZURI, A. SILVA, J. ALVAREZ, y R.B. HERBERMAN (1979) J. Immunol. 123, 252.
232. J. RODER, y R. KIESSLING (1978) Scand. J. Immunol. 8, 135.
233. S. TARGAN, E. GRIM y B. BONAVIDA (1979) J. Clin. Lab. Immunol. "En prensa".
234. S. TARGAN y F. DOREY (1980) J. Immunol. 124, 2157.
235. K. SHORTMAN y P. GOLSTEIN (1979) J. Immunol. 123, 833.
236. E. GRIM y B. BONAVIDA (1979) J. Immunol. 123, 2861.
237. D. ZAGURY, J. BERNARD, P.-J. JEANNESSON, N. THIERNESSE y J.C. CEROTTINI (1979) J. Immunol. 123, 1604.

- 238. J. RODER (1980) En "Natural Cell-Mediated Immunity Against Tumors". Ed. R.B. Herberman. Acad. Press.N.Y. p. 161.
- 239. J. ZARLING, L. ESKRA, E. BORDEN, J. HOROSZWICZ y W. CARTER (1979) J. Immunol. 123, 63.
- 240. E. SASKELA, T. TIMONEN y K. CANTELL (1979) Scand. J. Immunol. 10, 257.
- 241. T. TIMONEN, E. SASKELA, I. VIRTANEN y K. KANTELL (1980) Eur. J. Immunol. 10, 403.
- 242. M.O. DE LANDAZURI, M. LOPEZ-BOTET, J. ORTALDO, T. TIMONEN, y R.B. HERBERMAN (1981) "Sometido para publicación".
- 243. R.B. HERBERMAN, T. TIMONEN, J. ORTALDO, G.D. BONNARD y E. GORELIK (1980) En " 4th International Congress of Immunology" Eds. M. Fougereau y J. Dausset. Acad. Press. N.Y. p. 691.